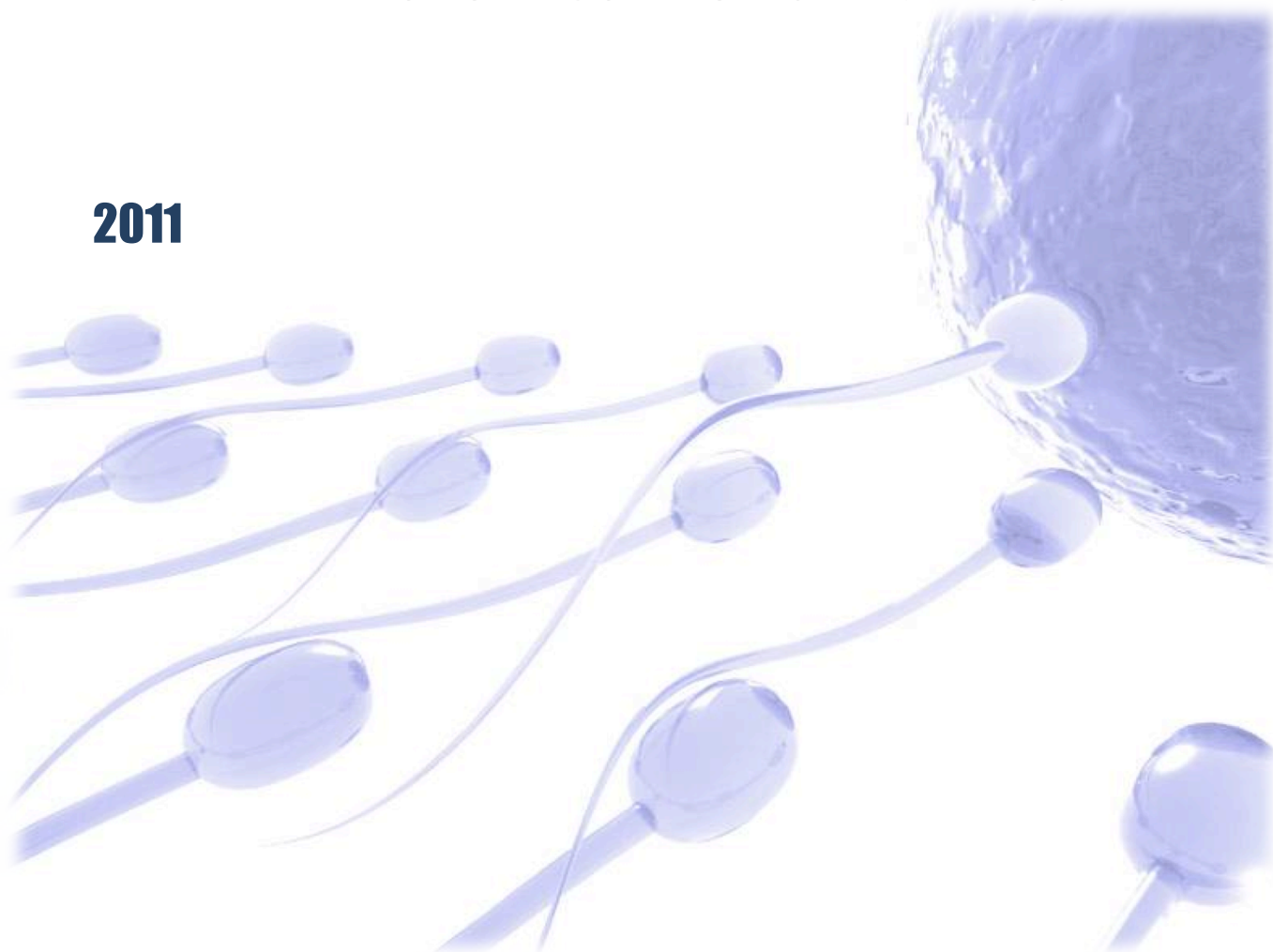


**TERAPÊUTICA NA DISFUNÇÃO
ERÉCTIL:
INFLUÊNCIA SOBRE A FERTILIDADE MASCULINA**

NUNO MIGUEL LOPES DE CAMPOS

2011



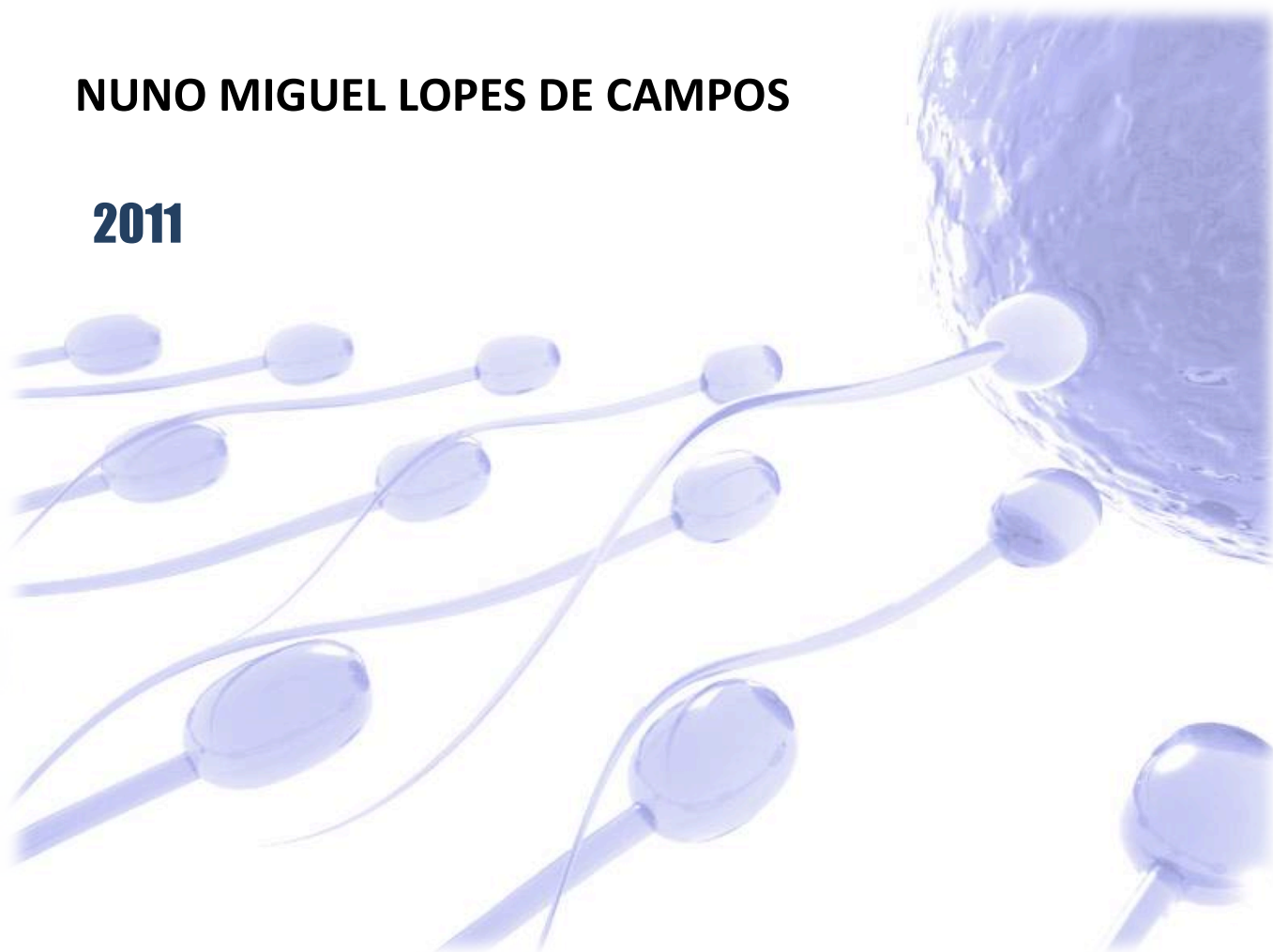
TERAPÊUTICA NA DISFUNÇÃO ERÉCTIL:

INFLUÊNCIA SOBRE A FERTILIDADE MASCULINA

**Dissertação orientada por
Professor Doutor Rui Manuel Amaro Pinto**

NUNO MIGUEL LOPES DE CAMPOS

2011



Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço ao Professor Doutor Rui Pinto por todos os ensinamentos, apoio e disponibilidade.

Aos meus professores do curso – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas – pelos conhecimentos transmitidos e dedicação em formar bons profissionais.

A todos os colegas da farmácia Bº de S. Miguel, por tudo o que me ensinaram, pelas sugestões e amizade.

A todo o grupo da farmácia hospitalar do CHCB, pelo interesse e apoio durante esta caminhada, bem como pela amizade e disponibilidade demonstradas.

Aos meus avós, que sempre me deram força para seguir em frente e conseguiram fazer de mim a pessoa que sou hoje. Um obrigado muito especial, do fundo do coração.

Aos meus pais, por todo o apoio e incentivo que sempre me deram. Obrigado por estarem sempre a meu lado.

À minha irmã, Filipa, por todos os conselhos e paciência durante todos estes anos.

A todos os meus amigos, desde aqueles mais próximos até aos mais distantes, pelo apoio e incentivo incondicional, os meus sinceros agradecimentos.

Por fim, um obrigado especial à Joana, pela compreensão e por me fazeres feliz.

Índice

ABREVIATURAS	1
RESUMO	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. DISFUNÇÃO ERÉCTIL	8
2.1. ANATOMIA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO	8
2.2. ESPERMATOGÉNESE	11
2.2.1. <i>Espermatozóide</i>	13
2.2.2. <i>Controlo da secreção de gonadotrofinas</i>	14
2.3. FISILOGIA DA ERECÇÃO	15
2.4. CAUSAS DA DE	17
2.5. AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	20
2.5.1. <i>Diagnóstico</i>	20
2.5.2. <i>Exames específicos</i>	22
2.6. TRATAMENTO.....	23
2.6.1. <i>Terapêutica de primeira linha</i>	23
2.6.2. <i>Terapêutica de segunda linha</i>	29
2.6.3. <i>Terapêutica de terceira linha</i>	30
3. FERTILIDADE MASCULINA.....	31
3.1. CAUSAS EXTERNAS DE INFERTILIDADE.....	31
3.1.1. <i>Agentes físicos</i>	32
3.1.2. <i>Agentes químicos</i>	32
3.2. ANÁLISE LABORATORIAL DO ESPERMA HUMANO	33
3.2.1. <i>Análise macroscópica</i>	33
3.2.2. <i>Análise microscópica</i>	34
3.2.3. <i>Classificação da qualidade do esperma</i>	37

4. MECANISMO DE ACÇÃO DOS INIBIDORES DA FOSFODIESTERASE 5	39
4.1. SISTEMAS DE SEGUNDO MENSAGEIRO	39
4.1.1. <i>Mecanismo de segundo mensageiro tirosina cinase</i>	<i>40</i>
4.1.2. <i>Mecanismo de segundo mensageiro DAG/proteína cinase C (PKC)</i>	<i>40</i>
4.1.3. <i>Iões cálcio (Ca^{2+})</i>	<i>41</i>
4.1.4. <i>Mecanismo de segundo mensageiro adenilato ciclase (AC)/AMP_c</i>	<i>41</i>
4.1.5. <i>Mecanismo de segundo mensageiro GC/GMP_c</i>	<i>42</i>
4.2. AMP _c E GMP _c NA REGULAÇÃO DA FUNÇÃO ERÉCTIL	43
4.3. REGULAÇÃO DA FUNÇÃO ERÉCTIL PELOS SISTEMAS DE SEGUNDO MENSAGEIRO	44
4.3.1. <i>Mecanismo de segundo mensageiro AC/AMP_c na função eréctil</i>	<i>44</i>
4.3.2. <i>Mecanismo de segundo mensageiro GC/GMP_c na função eréctil</i>	<i>44</i>
4.4. FOSFODIESTERASES (PDEs): CONSIDERAÇÕES GERAIS	45
4.5. ISOFORMAS DE PDE NO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO	52
4.5.1. <i>Isoformas de PDE no espermatozóide humano</i>	<i>53</i>
4.6. OS INIBIDORES DA PDE5 NO TRATAMENTO DA DE	53
4.7. EFEITO DOS INIBIDORES NÃO-SELECTIVOS DA PDE NOS PARÂMETROS DO ESPERMA	55
4.8. INIBIDORES SELECTIVOS DA PDE5 E OS PARÂMETROS DO ESPERMA: ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	56
4.9. INIBIDORES SELECTIVOS DA PDE5 E OS PARÂMETROS DO ESPERMA: ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	59
5. CONCLUSÃO	62
6. ANEXOS	64
BIBLIOGRAFIA	66

Abreviaturas

ABP – Proteína ligadora de androgénios (androgen-binding protein)

AC – Adenilato ciclase

Ach – Acetilcolina

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AMP_C – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclica

ATP – Adenosina trifosfato

CI₅₀ – Concentração de inibidor necessária para inibir 50% da actividade enzimática

DAG – Diacilglicerol

DE – Disfunção erétil

DHT – Dihidrotestosterona

DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crónica

EGF – Factor de crescimento epidérmico

EMA – European Medicines Agency

FDA – Food and Drug Administration

FSH – Hormona foliculoestimulina

GC – Guanilato ciclase

GMP_C – Guanosina 3',5'-monofosfato cíclica

GnRH – Hormona libertadora de gonadotrofinas

GTP – Guanosina 5'-trifosfato

IBMX – 3-isobutil-1-metilxantina

IM – Imobilidade

IP₃ – Inositol-1,4,5,-trifosfato

LH – Hormona luteoestimulina

NO – Óxido nítrico

NOS – Síntase do ácido nítrico

NP – Motilidade não progressiva

PDE – Fosfodiesterase

PIP₂ – Fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato

PKA – Proteína cinase A

PKC – Proteína cinase C

PKG – Proteína cinase G

PR – Motilidade progressiva

PTX – Pentoxifilina

RCM – Resumo das características do medicamento

VIP – Peptido vasoactivo intestinal (Vasoactive Intestinal Peptide)

Resumo

A disfunção erétil (DE) é uma patologia que tem vindo a evidenciar-se cada vez mais na nossa sociedade. O aumento da esperança média de vida é uma das grandes causas para que esta disfunção sexual se torne num problema de saúde pública. No entanto, existem outros factores de risco, sendo preponderante que recaia sobre este tema alguma atenção.

O objectivo desta dissertação é elucidar o efeito dos inibidores da fosfodiesterase 5 (PDE5) na fertilidade masculina. É feita uma abordagem à fisiologia do sistema reprodutor masculino, para que se possa perceber melhor o seu papel na fertilidade masculina. Além disso, é também importante saber quais as terapêuticas alternativas que um paciente com DE tem disponíveis e, ainda, a razão pela qual a farmacoterapia oral é a que revela maior adesão. A revisão bibliográfica apresentada permite estabelecer uma relação entre os diferentes mecanismos de acção e a influência que os inibidores da PDE5 têm sobre cada um desses mecanismos. São interpretados alguns estudos *in vivo* e *in vitro* de modo a perceber qual o efeito dos inibidores da PDE5 nos parâmetros do espermatozóide e na sua capacidade de fertilização. Apesar dos resultados serem controversos, foram demonstrados alguns efeitos positivos na motilidade dos espermatozóides. Deste modo, com a ajuda dos inibidores da PDE5, poderá haver melhoria dos resultados relacionados com a fertilidade.

Palavras-Chave: disfunção erétil, infertilidade masculina, inibidores da fosfodiesterase 5, espermatozóide, óxido nítrico.

Abstract

Erectile dysfunction (ED) is a condition that has been increasingly common in our society. The increase in average life expectancy is a major cause for this sexual dysfunction to become a public health problem. However, there are other risk factors that should be considered as well.

The aim of this dissertation is to elucidate the effect of phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibitors in male fertility. It's important to understand the role of the physiology of male reproductive system in male's fertility. Moreover, it is also important to know which alternative therapies are available for a patient with ED and also the reason why the oral pharmacotherapy is the most chosen. The review presented establishes the link between the different mechanisms of action and the influence PDE5 inhibitors have on each of these mechanisms. Several *in vivo* and *in vitro* studies have been carried out in order to understand whether PDE5 inhibitors affect positively or negatively sperm parameters and sperm fertilizing capacity. Despite the controversial results, studies demonstrate a positive effect of PDE5 inhibitors on sperm motility. Thus, PDE5 inhibitors might be a revolutionary agent for the alleviation of male infertility.

Keywords: erectile dysfunction, male infertility, phosphodiesterase 5 inhibitors, spermatozoa, nitric oxide.

1. Introdução

A disfunção erétil (DE) é definida como a incapacidade persistente em alcançar e/ou manter uma erecção por tempo suficiente que permita ter relações sexuais ou outra actividade sexual (ESSM.org, 2010; Malekmakan *et al.*, 2011; NIHCCPI, 1993). Apesar de, frequentemente, ser referida como impotência, o termo DE é o mais aconselhado pois define com maior precisão o problema e tem menor carácter depreciativo (Miller, 2000).

A DE afecta, pelo menos, um em cada dez homens e estima-se que apenas 10% se encontra a receber tratamento (ESSM.org, 2010). A sua prevalência é notoriamente dependente da idade, factor que é preponderante quando falamos de um aumento da esperança média de vida e, consequentemente, do aumento da população idosa. No estudo epidemiológico *Massachussets Male Aging Study* (MMAS) verificou-se que esta doença afecta 29% dos homens entre os 40-49 anos, 50% entre os 50-59 anos e 74% entre os 60-69 anos. Este estudo demonstrou ainda que 52% dos homens com idade compreendida entre 40 e 70 anos relataram algum grau de DE (Feldman *et al.*, 1994; Kasper *et al.*, 2006). Na pesquisa *National Health and Social Life Survey* (NHSLS), que foi uma amostra representativa de homens e mulheres com 18-59 anos de idade, 10% dos homens relataram serem incapazes de manter uma erecção. A incidência foi mais alta na faixa etária de 50-59 anos (21%) e também em homens sócio-economicamente desfavorecidos (14%), divorciados (14%) e com menor nível educacional (13%) (Kasper *et al.*, 2006). Na Europa, estima-se que mais de 30 milhões de homens sejam afectados pela DE e que, em 2025, este número possa aumentar para cerca de 43 milhões (Ayta *et al.*, 1999). Em Portugal, a DE apresenta uma prevalência global de, aproximadamente, 13% e continua a ser um tema abordado com alguma dificuldade, mesmo com o médico de família (Episex-pt, 2006).

A idade é uma das variáveis que mais se associa à DE (Feldman *et al.*, 1994; Laumann *et al.*, 1999; Rajmil *et al.*, 2011). No entanto, existem outros factores que também podem potenciar o seu desenvolvimento como é o caso de algumas doenças (e.g., hipertensão, diabetes, hipercolesterolemia, obesidade, depressão) e da medicação que lhes é associada (e.g., anti-hipertensores, antidepressivos), da irradiação ou cirurgia da zona pélvica, do estilo de vida sedentário, do alcoolismo e do tabagismo (Benet *et al.*, 1995; Derby *et al.*, 2000; Feldman *et al.*, 1994; Jackson *et al.*, 2002; Marques, 2010; NIHCCPI, 1993). Há estudos que demonstram uma forte associação do síndrome metabólico à DE (Rajmil *et al.*, 2011).

A causa da DE pode ser psicogénica (stress do emprego, ansiedade de performance, problemas financeiros, depressão, entre outros) mas a grande maioria é de causa orgânica (vasculogénica, neurológica, anatómica ou estrutural, hormonal e/ou induzida por fármacos). Além disso, pode ainda haver associações entre causas psicogénicas e orgânicas que provoquem DE (Kasper *et al.*, 2006; Marques, 2010).

Apesar de ser uma doença benigna, a DE altera de forma muito significativa a qualidade de vida, tanto do doente como da sua parceira. Contudo, é importante lembrar que, independentemente da sua causa, existe tratamento para a maioria dos casos de DE (Marques, 2010).

A terapêutica no tratamento da DE encontra-se dividida em três linhas. A farmacoterapia oral é uma das mais importantes e, actualmente, encontra-se direccionada para a fosfodiesterase do tipo 5 (PDE5). As fosfodiesterases dos nucleótidos cíclicos (PDEs) são enzimas que regulam os níveis celulares de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) e de guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc), através do controlo das taxas de degradação destes nucleótidos cíclicos. O aumento dos níveis intracelulares de AMPc e GMPc através da inibição das PDEs constitui uma estratégia extremamente útil para a obtenção de diversos efeitos farmacológicos, com aplicação clínica relevante no caso de doenças como a DE (Dimitriadis *et al.*, 2008).

A diferente distribuição tecidual e celular e a grande diversidade na estrutura, regulação e função das isoenzimas de PDEs, tornam possível o desenvolvimento de inibidores selectivos para cada uma das isoenzimas, dotados de grande interesse farmacológico.

O sucesso clínico e comercial de vários medicamentos utilizados no tratamento da disfunção erétil, tais como o Viagra[®], o Cialis[®] e o Levitra[®], cujos princípios activos (sildenafil, tadalafil e vardenafil, respectivamente) são inibidores das PDEs, constitui o exemplo mais mediático do potencial destas enzimas como alvos da terapêutica farmacológica.

É importante também não esquecer que a lista das potenciais utilizações dos inibidores da PDE5 na terapêutica farmacológica é bastante vasta. Estudos pré-clínicos e clínicos recentes indicaram o seu potencial efeito benéfico em várias formas de disfunção endotelial (Hryniewicz *et al.*, 2005), na síndrome de Raynaud (Boin *et al.*, 2005), na hipertrofia cardíaca (Takimoto *et al.*, 2005), na cardioprotecção após isquemia (Bremer *et al.*, 2005), na

neurogénese e recuperação neurológica após acidente vascular cerebral (Zhang *et al.*, 2006a; Zhang *et al.*, 2006b), nos défices cognitivos (Prickaerts *et al.*, 2005; Prickaerts *et al.*, 2004; Prickaerts *et al.*, 2002), na insuficiência renal crónica (Rodriguez-Iturbe *et al.*, 2005), na ejaculação precoce (Montorsi *et al.*, 2004a), nos sintomas do tracto urinário inferior associados à hipertrofia benigna da próstata (Montorsi *et al.*, 2004a), em certas formas de disfunção sexual feminina (Mayer *et al.*, 2005) e no tratamento da leucemia linfocítica crónica de células B (Sarfati *et al.*, 2003).

Esta dissertação disponibiliza informação sobre a terapêutica farmacológica oral (inibidores da PDE5) existente para tratamento da DE, mostrando todos os efeitos positivos e negativos que estes fármacos provocam na fertilidade masculina.

2. Disfunção Erétil

2.1. Anatomia do sistema reprodutor masculino

O aparelho reprodutor masculino (Figura 1) é composto pelas gónadas (testículos), ductos (epidídimos, canal deferente e uretra), glândulas (vesículas seminais, próstata e glândulas bulbo-uretrais) e estruturas de suporte (escroto e pênis) (Seeley *et al.*, 2004).

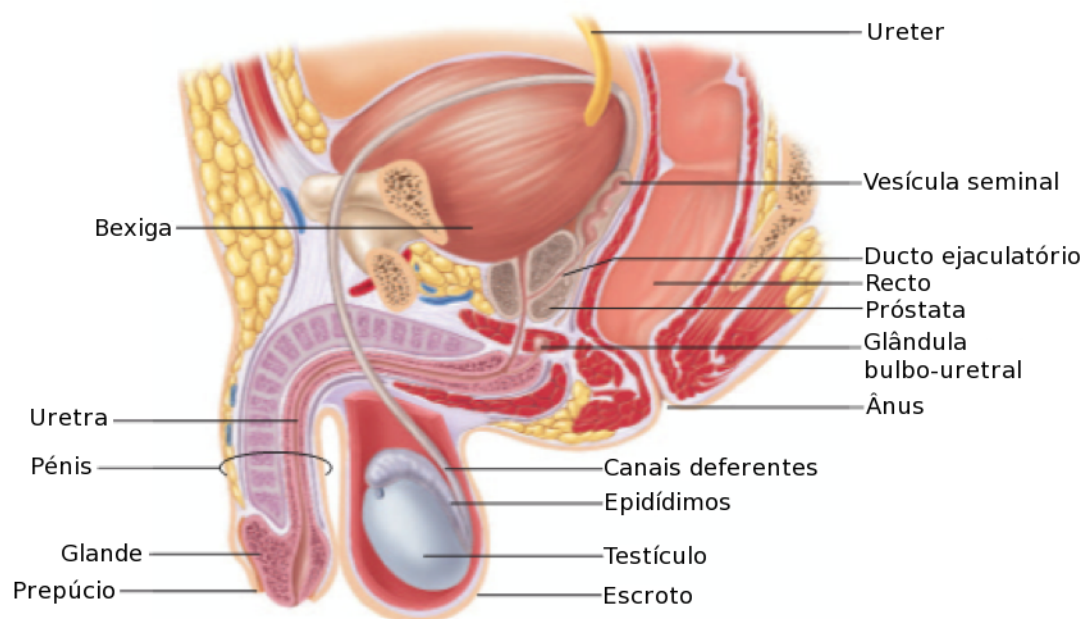


Figura 1 – Anatomia do sistema reprodutor masculino (Seeley *et al.*, 2004)

Uma vez que as células do esperma são sensíveis à temperatura e não se desenvolvem normalmente à temperatura corporal, os testículos e os epidídimos encontram-se localizados fora da cavidade abdominal, no escroto, onde a temperatura é mais baixa (Seeley *et al.*, 2004).

Os testículos são pequenos órgãos ovóides com 4-5 cm de diâmetro. São mutuamente considerados glândulas exócrinas e endócrinas uma vez que os espermatozóides formam grande parte da secreção exócrina dos testículos e a testosterona é a principal secreção endócrina produzida por eles. Os testículos apresentam 300-400 lóbulos e cada um contém 1 a 4 túbulos seminíferos, apresentando um total de cerca de 900. Estes têm um diâmetro de 150-250 μm e um comprimento de 30-70 cm. É no interior dos testículos, mais concretamente nos túbulos seminíferos, que ocorre a espermatogénese (Seeley *et al.*, 2004).

Após serem libertados nos túbulos seminíferos, os canais eferentes transportam os espermatozóides e convergem no ducto epididimal. O epidídimo, que está apoiado nos testículos, é um tubo em forma de espiral com aproximadamente 5 metros de comprimento e é formado por cabeça, corpo e cauda, terminando no canal deferente. Os espermatozóides são armazenados nos epidídimos durante o período de maturação. É necessário que o processo de maturação dos espermatozóides seja de 18-24 dias para que estes desenvolvam capacidades de mobilidade (Fox, 2004; Seeley *et al.*, 2004).

Os canais deferentes vão desde cada cauda dos epidídimos até à parte posterior da próstata e entram na uretra. Os espermatozóides podem acumular-se neste órgão durante um mês sem que percam as suas características fertilizantes (Seeley *et al.*, 2004).

As vesículas seminais têm cerca de 5 cm de comprimento e a sua função é produzir uma secreção espessa de cor amarela, rica em frutose, ácido cítrico prostaglandinas e fibrinogénio. Cada vesícula seminal termina num tubo de drenagem, cuja união com a extremidade de cada canal deferente proporciona a formação de uma estrutura tubular comum, denominada canal ejaculador (Seeley *et al.*, 2004).

A próstata é um órgão com forma e tamanho de uma noz constituído, essencialmente, por tecido glandular e muscular. Possui inúmeras estruturas tubulares ocas interiormente revestidas por células que se encarregam da produção de uma secreção rica em ácido cítrico, cálcio, fosfato e profibrinolisinase. Este fluido apresenta um pH que favorece a motilidade e a capacidade fecundante dos espermatozóides. A união dos vários túbulos entre si proporciona a formação de cerca de 15-30 canais, que desaguam através de estreitas aberturas na uretra. No momento da ejaculação, a secreção da próstata junta-se com o líquido proveniente das vesículas seminais e com os espermatozóides provenientes dos testículos (Seeley *et al.*, 2004).

As glândulas bulbo-uretrais (também chamadas de glândulas de Cowper) produzem uma secreção anterior à ejaculação. Esta secreção provoca a lubrificação da uretra, neutraliza os componentes ácidos derivados da urina e ajuda a diminuir a acidez no interior da vagina (Seeley *et al.*, 2004).

O pénis (Figura 2) é um órgão cilíndrico cujo interior é atravessado pela uretra. É possível distinguir três porções: a raiz, através da qual se encontra fixo ao tronco; o corpo, que

corresponde à parte central; e uma extremidade denominada glândula, em cuja ponta se encontra a abertura da uretra para o exterior. O seu interior encontra-se essencialmente ocupado por três corpos cilíndricos constituídos por um tecido erétil específico em que o seu ingurgitamento com sangue provoca o aumento de tamanho e consistência, processo chamado de ereção. Duas destas estruturas são os corpos cavernosos e encontram-se na parte superior do corpo de pénis. São simétricos e paralelos um ao outro. O terceiro corpo cilíndrico é o corpo esponjoso, situado numa posição central por baixo das anteriores e que é atravessado longitudinalmente pela uretra, cuja extremidade se dilata para ocupar todo o interior da glândula (Seeley *et al.*, 2004).

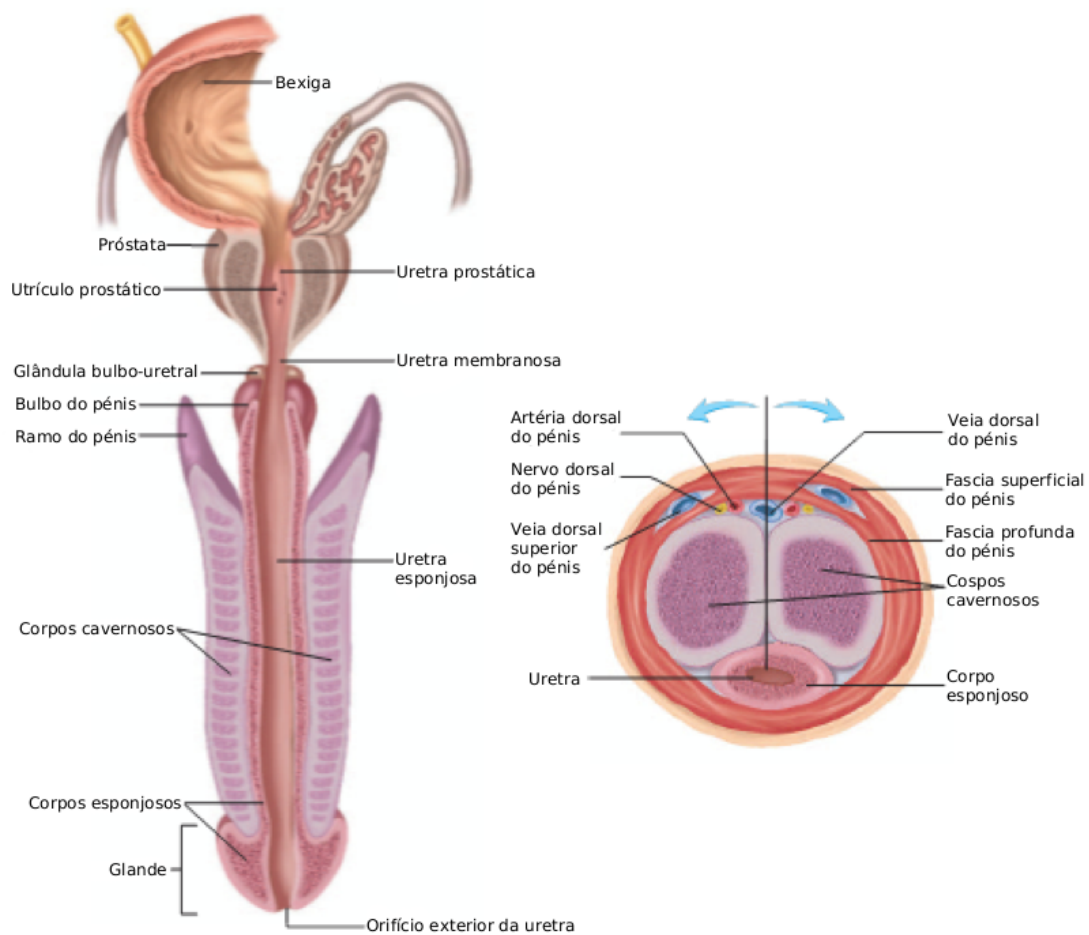


Figura 2 – Anatomia do pénis (Seeley *et al.*, 2004)

2.2. Espermatogénese

A espermatogénese (Figura 3) é o processo de desenvolvimento das células da linha germinativa e é visível através de um corte transversal de um dos túbulos seminíferos (Seeley *et al.*, 2004).

Os túbulos seminíferos são constituídos por células da linha germinativa e por células de Sertoli. As células de Sertoli estendem-se da periferia até ao lúmen e são responsáveis por fornecer nutrientes às células germinativas. Além disso, estas células são importantes em todo o processo de espermatogénese pois protegem os espermatozóides de uma resposta autoimune (por um lado, devido às *tight junctions* que formam uma barreira hematotesticular e, por outro, devido ao ligando FAS produzido pelas células de Sertoli que provoca a apoptose dos linfócitos T) (Fox, 2004; Seeley *et al.*, 2004).

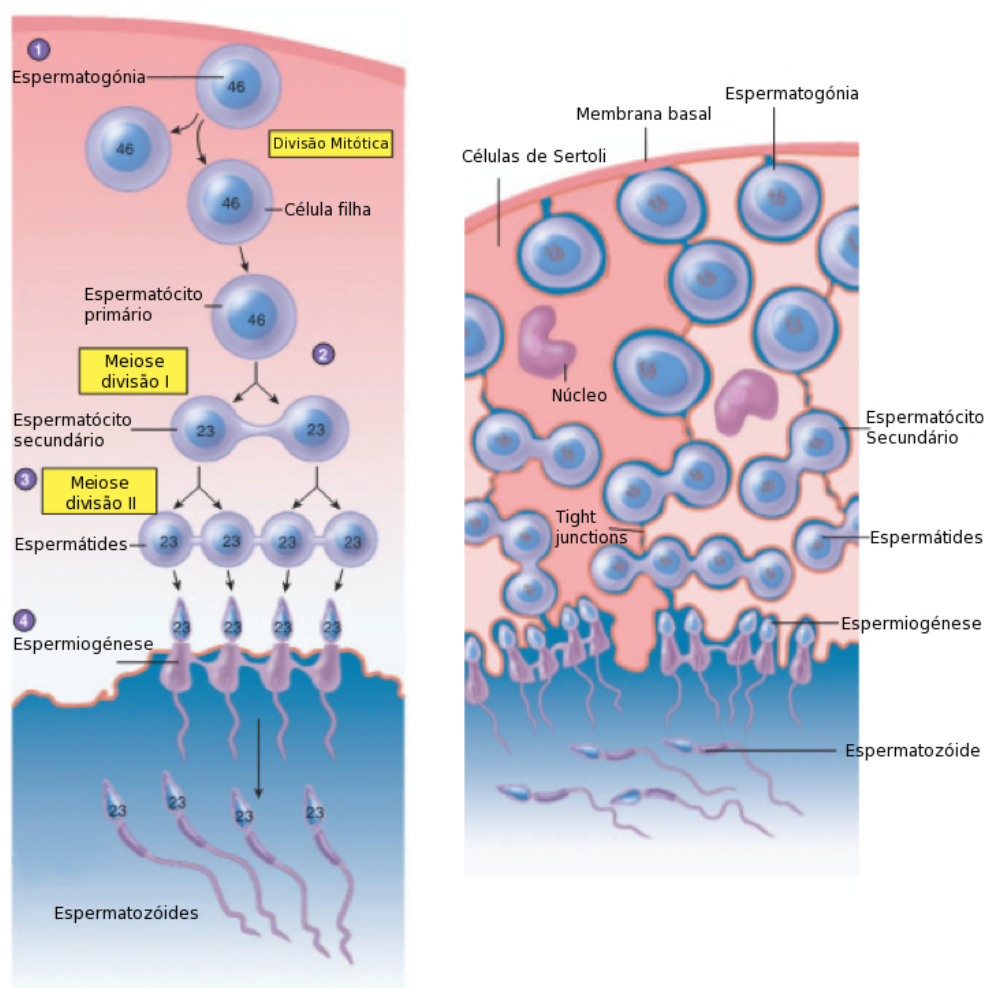


Figura 3 – Espermatogénese (Seeley *et al.*, 2004)

Na zona exterior dos túbulos seminíferos encontram-se as células intersticiais ou de Leydig que, conjuntamente com as células de Sertoli, produzem hormonas, tais como androgénios, estrogénios e inibinas (Seeley *et al.*, 2004).

As células de Leydig produzem testosterona que se liga aos receptores presentes nas células de Sertoli. Esta combinação é essencial para o seu funcionamento normal. É nestas células que a testosterona é convertida pelo enzima α -reductase em dihidrotestosterona (DHT) e estrogénio. A célula de Sertoli também produz uma proteína ligadora de androgénios (ABP) para o interior dos túbulos seminíferos. Esta proteína liga-se à testosterona e faz aumentar a sua concentração no lúmen (Fox, 2004; Seeley *et al.*, 2004).

A importância das células de Sertoli é reforçada pelo facto de possuir receptores FSH (hormona foliculoestimulina), fazendo com que qualquer estimulação da espermatogénese induzida pela FSH seja mediada pela acção das células de Sertoli (Fox, 2004; Seeley *et al.*, 2004).

A testosterona e a DHT ligam-se à ABP e são transportadas até aos epidídimos. O estradiol e a DHT são as hormonas que promovem o processo de formação dos espermatozóides (Seeley *et al.*, 2004).

As células da linha germinativa encontram-se nos túbulos seminíferos, dispostas segundo o seu grau de maturidade. As espermatogónias são as células menos maduras e encontram-se na periferia. São células diploides (46 cromossomas) que sofrem processos de mitose e meiose para originar espermatozóides. Assim, a espermatogónia divide-se por mitose de modo a que uma das células filhas continue espermatogónia e a outra prossiga a sua divisão como espermatócito primário (46 cromossomas). Após a primeira divisão da meiose, o espermatócito primário origina dois espermatócitos secundários (23 cromossomas cada). A segunda divisão da meiose origina 4 espermátides haploides que se diferenciam em espermatozóides por um processo chamado espermiogénese (Fox, 2004; Seeley *et al.*, 2004).

Após a diferenciação, o espermatozóide encontra-se então preparado para o processo de fecundação. Ao encontrar o ócito secundário, o espermatozóide liberta enzimas digestivas (reacção acrossómica) que lhe permitem penetrar no interior do óvulo (Fox, 2004).

2.2.1. Espermatozóide

O espermatozóide (Figura 4) é constituído por uma cabeça de forma oval, uma peça intermédia e uma cauda. A cabeça tem 4-5 μm no eixo maior e 2,5-3,5 μm no eixo menor. No seu interior existe um núcleo, onde se encontra o ADN, e o acrossoma, onde estão contidos os enzimas necessários para que o espermatozóide possa penetrar no interior do óvulo. O centríolo encontra-se localizado na zona posterior da cabeça. A peça intermédia tem 6-7,5 μm de comprimento e uma largura de 1 μm . É nesta peça que se encontram as mitocôndrias que produzem ATP, dando energia à cauda para o percurso do espermatozóide. A cauda tem um comprimento de, aproximadamente, 45 μm e é o movimento dos microtúbulos que impulsiona o espermatozóide (Fox, 2004; Seeley *et al.*, 2004).

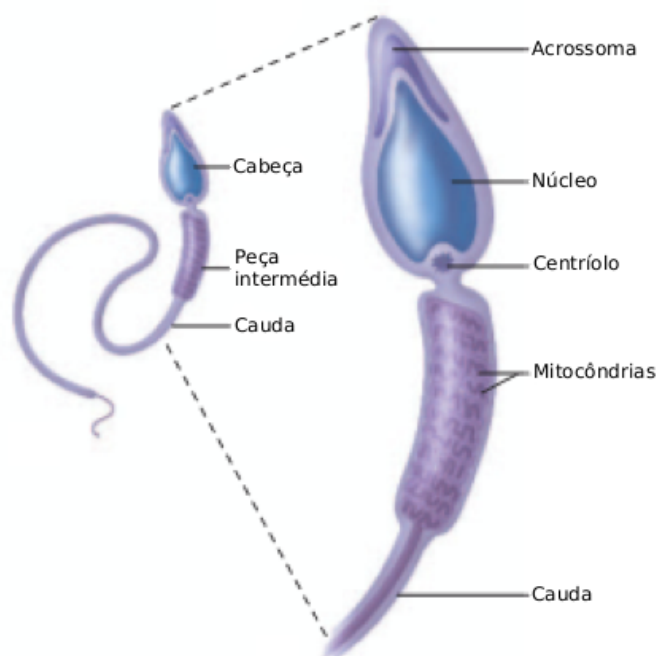


Figura 4 – Espermatozóide (Seeley *et al.*, 2004)

Os isoenzimas de PDEs que vão ser apresentadas ao longo deste trabalho encontram-se identificados em várias porções constituintes do espermatozóide. Por exemplo, a isoforma PDE1A pode ser encontrada na peça intermédia e na cauda, enquanto a isoforma PDE3A está localizada no acrossoma. A PDE5, sobre a qual incide este trabalho, é encontrada na cabeça e cauda do espermatozóide (Seeley *et al.*, 2004).

2.2.2. Controlo da secreção de gonadotrofinas

A função do sistema reprodutor masculino é dependente de mecanismos hormonais e neuronais. As hormonas são responsáveis pelo desenvolvimento das estruturas reprodutivas e manutenção das suas capacidades funcionais. Além disso, também ajudam a desenvolver as características sexuais secundárias e no controlo da formação de espermatozóides. O mecanismo neuronal encontra-se envolvido no comportamento sexual e no controlo do acto sexual (Seeley *et al.*, 2004).

O mecanismo hormonal que influencia o sistema reprodutor masculino envolve o hipotálamo, a hipófise e os testículos (Figura 5). A hormona libertadora de gonadotrofina (GnRH) é libertada pelos neurónios no hipotálamo e estimula a hipófise anterior a produzir gonadotrofinas. Essas gonadotrofinas são a luteoestimulina (LH) e a foliculoestimulina (FSH). As hormonas LH e FSH desempenham um papel importante no sistema reprodutor masculino, uma vez que estimulam a espermatogénese e a secreção de testosterona (Fox, 2004; Seeley *et al.*, 2004).

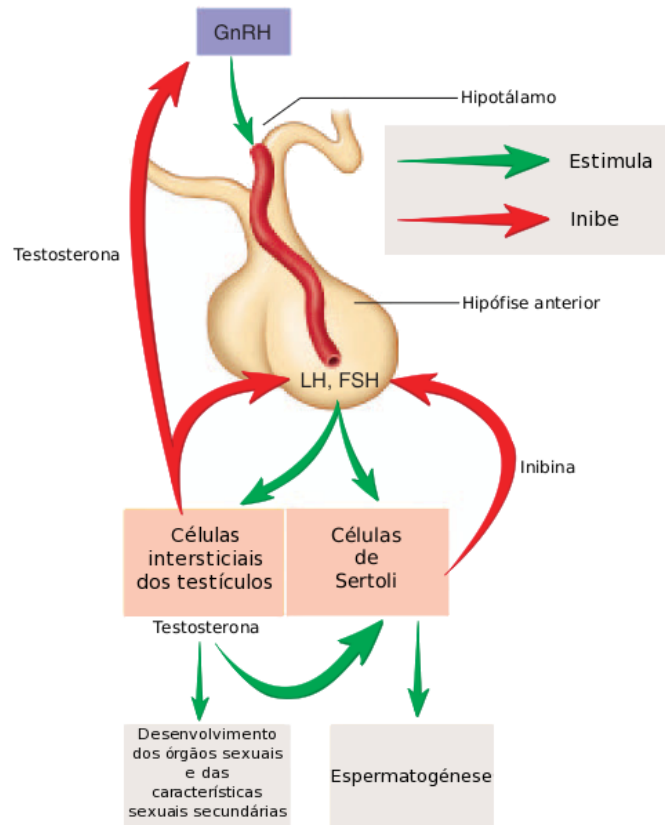


Figura 5 – Regulação da secreção das hormonas sexuais masculinas (Seeley *et al.*, 2004)

O cérebro contém receptores de testosterona que o tornam num órgão alvo para esta hormona. Como referido anteriormente, a testosterona é convertida em DHT pela acção da 5α -reductase. Alternativamente, a testosterona pode também ser convertida em 17β -estradiol no cérebro pela acção do enzima aromatase. O estradiol formado a partir da testosterona é necessário para criar um feedback negativo na secreção da gonadotrofina LH. A FSH também é controlada por feedback negativo mas, neste caso, a hormona que inibe esta gonadotrofina é a inibina, produzida pelas células de Sertoli (Fox, 2004; Seeley *et al.*, 2004).

2.3. Fisiologia da Ereção

A erecção requer um aumento do afluxo de sangue no pénis, como consequência do relaxamento do tecido muscular liso dos corpos cavernosos, e é acompanhada pelo aumento do comprimento, rigidez do pénis e compressão dos plexos nervosos contra a túnica albugínea (Dimitriadis *et al.*, 2008; Fox, 2004; Kasper *et al.*, 2006).

A resposta erétil é mediada por uma combinação de inervação central (psicogénica) e periférica (reflexogénica). As fibras nervosas parassimpáticas que chegam ao pénis surgem de neurónios pré-ganglionares parassimpático-colinérgicos dos segmentos espinhais da zona sacral (Kasper *et al.*, 2006). Estes nervos libertam vários neurotransmissores incluindo óxido nítrico (NO), acetilcolina (ACh) e péptido vasoactivo intestinal (VIP), que têm a capacidade de provocar o relaxamento do músculo liso presente nos corpos cavernosos (Cirino *et al.*, 2006; Dimitriadis *et al.*, 2008).

O NO, composto de curta vida e mediador nas interacções celulares, é sintetizado, a partir do precursor L-arginina, pelos nervos neuronais e células endoteliais do tecido (Burnett, 2002; Dimitriadis *et al.*, 2008). A produção de NO requer NO sintases (NOS) que apresentam três isoformas principais: neuronal (NOS_n), induzida (NOS_i) e endotelial (NOS_e) (Forstermann *et al.*, 1998). Este é um potente vasodilatador que, quando sintetizado pela NOS_n , tem como função provocar o relaxamento dos músculos lisos dos corpos cavernoso e, quando sintetizado pela NOS_e , é essencial para a manutenção desse relaxamento (Andersson, 2003).

A libertação de NO activa os enzimas guanilato ciclase (GC) presentes no citosol, que são responsáveis pela conversão da guanosina 5'-trifosfato (GTP) em guanosina 3',5'-

monofosfato cíclica (GMP_c). Esta actua no músculo liso dos corpos cavernosos, activando a proteína cinase G (PKG). Este enzima provoca a abertura dos canais de potássio e a hiperpolarização da membrana muscular. O cálcio citosólico decresce e há um bloqueio dos canais de Ca²⁺ para evitar o seu influxo. Deste modo, os mecanismos de segundo mensageiro são muito importantes no processo de erecção pois é através deles que o relaxamento do músculo liso dos corpos cavernosos se torna possível (Dimitriadis *et al.*, 2008; Fox, 2004; Hedlund *et al.*, 2000; Kasper *et al.*, 2006).

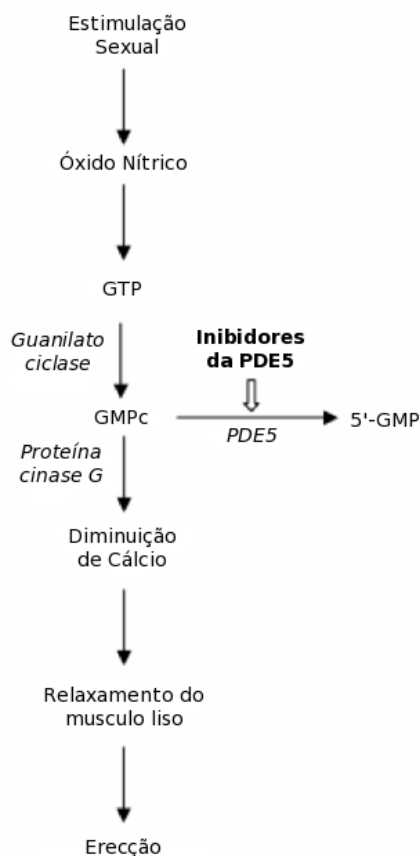


Figura 6 – Diagrama esquemático que ilustra o mecanismo de acção dos inibidores da PDE5 utilizados no tratamento da disfunção erétil. A estimulação sexual origina a libertação de NO das terminações neuronais localizadas nos corpos cavernosos do pénis. O NO activa a guanilciclase, que produz GMPC a partir do GTP. O GMPC origina relaxamento do músculo liso vascular do pénis conduzindo à erecção. Os inibidores da PDE5 inibem a degradação do GMPC pela PDE5 presente nos corpos cavernosos do pénis, potenciando a função erétil (Wright, 2006)

O NO isolado também tem a capacidade de provocar relaxamento do músculo liso, uma vez que estimula a Na⁺/K⁺-ATP, resultando na hiperpolarização do músculo liso. Deste modo, os canais de cálcio são inibidos e a contracção muscular é atenuada (Burnett, 2002).

A ejaculação é estimulada pelo sistema nervoso simpático, que resulta na contracção do epidídimo, dos canais deferentes, das vesículas seminais e da próstata, provocando a entrada do líquido seminal na uretra. A emissão do líquido seminal é seguida por contracções rítmicas dos músculos bulbocavernosos e isquiocavernosos, provocando a ejaculação (Kasper *et al.*, 2006).

A detumescência é mediada pela norepinefrina libertada pelos nervos simpáticos. Esta é provocada pela libertação de endotelina produzida na superfície vascular e pela contracção da musculatura lisa induzida pela activação de receptores α -adrenérgicos pós-sinápticos, eventos que aumentam o fluxo de saída de sangue venoso e restabelecem o estado flácido (Kasper *et al.*, 2006).

2.4. Causas da DE

A DE pode advir de três mecanismos básicos: (1) dificuldade para iniciar (psicogénica, endócrina ou neurogénica); (2) dificuldade para encher (arteriogénica); ou (3) dificuldade para armazenar (disfunção venooclusiva) volume sanguíneo suficiente dentro da rede lacunar. Essas categorias não se excluem mutuamente e é bastante frequente o factor psicogénico coexistir com outros factores etiológicos. Causas diabéticas, ateroscleróticas e relacionadas com drogas são responsáveis por mais de 80% dos casos de DE em homens idosos (Kasper *et al.*, 2006).

Vasculogénica – a causa orgânica mais frequente de DE é um distúrbio do fluxo sanguíneo de entrada e saída do pénis. As doenças aterosclerótica ou traumática podem diminuir o fluxo para os espaços lacunares, resultando na rigidez diminuída. Alterações estruturais nos componentes fibroelásticos podem causar perda da complacência e incapacidade de comprimir as veias da túnica, o que pode advir do envelhecimento, do cruzamento aumentado das fibras de colagénio ou alteração da síntese de colagénio associada à hipercolesterolemia (Kasper *et al.*, 2006). Doenças como hipertensão, hipercolesterolemia e outras doenças cardiovasculares, bem como o tabagismo e a obesidade podem provocar DE vasculogénica (Marques, 2010).

Neurogénica – distúrbios que afectam a medula espinhal sacra impedem o relaxamento do músculo liso peniano pelo sistema nervoso, provocando DE. Pacientes com lesões ou traumatismos incompletos da parte superior da medula espinhal são mais propensos a manter a capacidade de obter uma erecção que os que apresentam lesões ou traumatismos completos da parte inferior. Outros distúrbios neurológicos comumente associados à DE incluem esclerose múltipla, doença de Parkinson, tumores cerebrais, acidentes vasculares cerebrais e neuropatia periférica, a última quase sempre decorrente de diabetes ou alcoolismo. A cirurgia

pélvica pode causar DE devido à ruptura dos nervos autónomos (Hatzimouratidis *et al.*, 2010; Kasper *et al.*, 2006; Marques, 2010).

Endócrina – os androgénios aumentam a libido, mas a sua participação exacta na função erétil continua incerta. Na verdade, os indivíduos com níveis muito baixos de testosterona podem alcançar erecções provocadas por estímulos visuais ou sexuais. Não obstante, níveis normais de testosterona parecem ser importantes para a função erétil, especialmente em homens mais velhos (Kasper *et al.*, 2006; Rajmil *et al.*, 2011). A diminuição da testosterona, o aumento da prolactina e os distúrbios da tiroide são exemplos de DE endócrina (Hatzimouratidis *et al.*, 2010; Marques, 2010).

Anatómica ou estrutural – deformações na estrutura do pénis podem impossibilitar o acto sexual. A doença de Peyronie, fractura peniana, curvatura peniana congénita, micropenis, hipospádias e epispádias são exemplos de DE causada por deformações anatómicas (Hatzimouratidis *et al.*, 2010).

Diabética – A DE ocorre em 35-75% dos homens com diabetes mellitus. Os mecanismos patológicos estão relacionados com complicações cardiovasculares e neurológicas associadas aos diabetes. Os indivíduos com diabetes também apresentam quantidades reduzidas de NOS, tanto nos tecidos endoteliais como neuronais (Deyoung *et al.*, 2011; Kasper *et al.*, 2006).

Psicogénica – Existem dois mecanismos que contribuem para a inibição da erecção na DE psicogénica. Por um lado, os estímulos psicogénicos na medula sacra podem inibir respostas reflexogénicas, bloqueando assim a activação dos impulsos vasodilatadores para o pénis. Por outro lado, a estimulação simpática excessiva no homem ansioso pode aumentar o tónus dos músculos lisos do pénis. As causas mais comuns de DE psicogénica são ansiedade quanto ao desempenho, depressão, conflito com a relação, perda de atracção, inibição sexual, conflitos acerca da preferência sexual, abuso sexual na infância e temor de gestação ou de doença sexual transmissível. Quase todos os pacientes com DE, mesmo quando a disfunção tem base claramente orgânica, desenvolvem uma componente psicogénica como uma reacção à DE (Kasper *et al.*, 2006).

Medicamentosa – estima-se que 25% dos homens atendidos em ambulatório de medicina geral sofram de DE induzida por fármacos. Embora muitos medicamentos possam causar DE, os pacientes apresentam, frequentemente, factores de risco concomitantes que confundem o

quadro clínico. No entanto, se houver forte associação entre a instituição de um fármaco e o início de DE, devem-se considerar medicamentos alternativos (Kasper *et al.*, 2006).

Tabela 1 – Fármacos associados à DE (Kasper *et al.*, 2006)

Classificação	Fármacos
Diuréticos	Tiazídicos
	Espironolactona
Anti-hipertensores	Bloqueadores dos canais de cálcio
	Metildopa
	Clonidina
	Reserpina
	Betabloqueadores
	Guanetidina
Cardíacos	Digoxina
Antidepressivos	Inibidores selectivos da recaptação da serotonina
	Antidepressivos tricíclicos
	Lítio
	Inibidores da monoaminoxidase
Antagonistas H₂	Ranitidina
	Cimetidina
Hormonas	Progesterona
	Estrogénios
	Corticosteróides
	Agonistas da GnRH
	Inibidores da 5 α -reductase
Citotóxicos	Ciclofosfamida
	Metotrexato

2.5. Avaliação Clínica

2.5.1. Diagnóstico

Para que se possam descobrir as possíveis causas de DE, é fundamental que a relação médico-paciente seja boa, uma vez que os tópicos em discussão são, muitas vezes, pessoais e constrangedores. Deste modo, as perguntas devem focar o início dos sintomas, a presença e a duração de ereções parciais e a progressão da DE. A referência de ereções nocturnas ou matinais é importante para distinguir DE orgânica de psicogénica (Kasper *et al.*, 2006; Rajmil *et al.*, 2011).

O paciente também deve ser inquirido acerca da presença de curvatura peniana ou dor durante o coito. O impulso sexual diminuído é, algumas vezes, um dos sinais de problemas endócrinos, por isso, convém dar especial foco à libido do paciente. É útil questionar se o episódio de DE se resume ao coito com uma ou outras parceiras; a DE circunstancial, por oposição à DE constante, sugere causas psicogénicas. A ejaculação é afectada com menor frequência, mas devem ser feitas perguntas acerca da ejaculação ser normal, precoce, tardia ou ausente (Kasper *et al.*, 2006).

O exame físico é um elemento essencial no diagnóstico de DE. Sinais de hipertensão, bem como evidências de doenças tiroideias, hepáticas, hematológicas ou renais devem ser pesquisados. Os sistemas endócrinos e vascular devem ser examinados, bem como os genitais e a próstata. O pénis deve ser palpado ao longo dos corpos à procura de placas fibróticas. O exame neurológico deve incluir o tónus do esfíncter anal, o reflexo bulbocavernoso e a pesquisa de neuropatia periférica (Kasper *et al.*, 2006).

A figura 7 ajuda a efectuar uma avaliação do diagnóstico em pacientes com ED.

Devido à elevada prevalência de riscos cardíacos associada a pacientes que procuram tratamento para a DE, foram criadas três categorias para definir melhor o risco cardiovascular. Na categoria de “baixo risco” estão incluídos os pacientes que não possuem nenhum risco cardíaco significativo associado à actividade sexual. Estes indivíduos não apresentam sintomas e possuem menos de três factores de risco para desenvolver doença coronária arterial. Os indivíduos na categoria de “risco intermédio” apresentam uma condição cardíaca incerta com três ou mais factores de risco para desenvolver doença coronária arterial. Dependendo da avaliação, o paciente deve passar para a categoria de “baixo risco”

ou “risco elevado”. Na categoria de “risco elevado” encontram-se os indivíduos com sintomas de doença cardíaca e que têm grande propensão a desenvolver arritmias (Hatzimouratidis *et al.*, 2010).

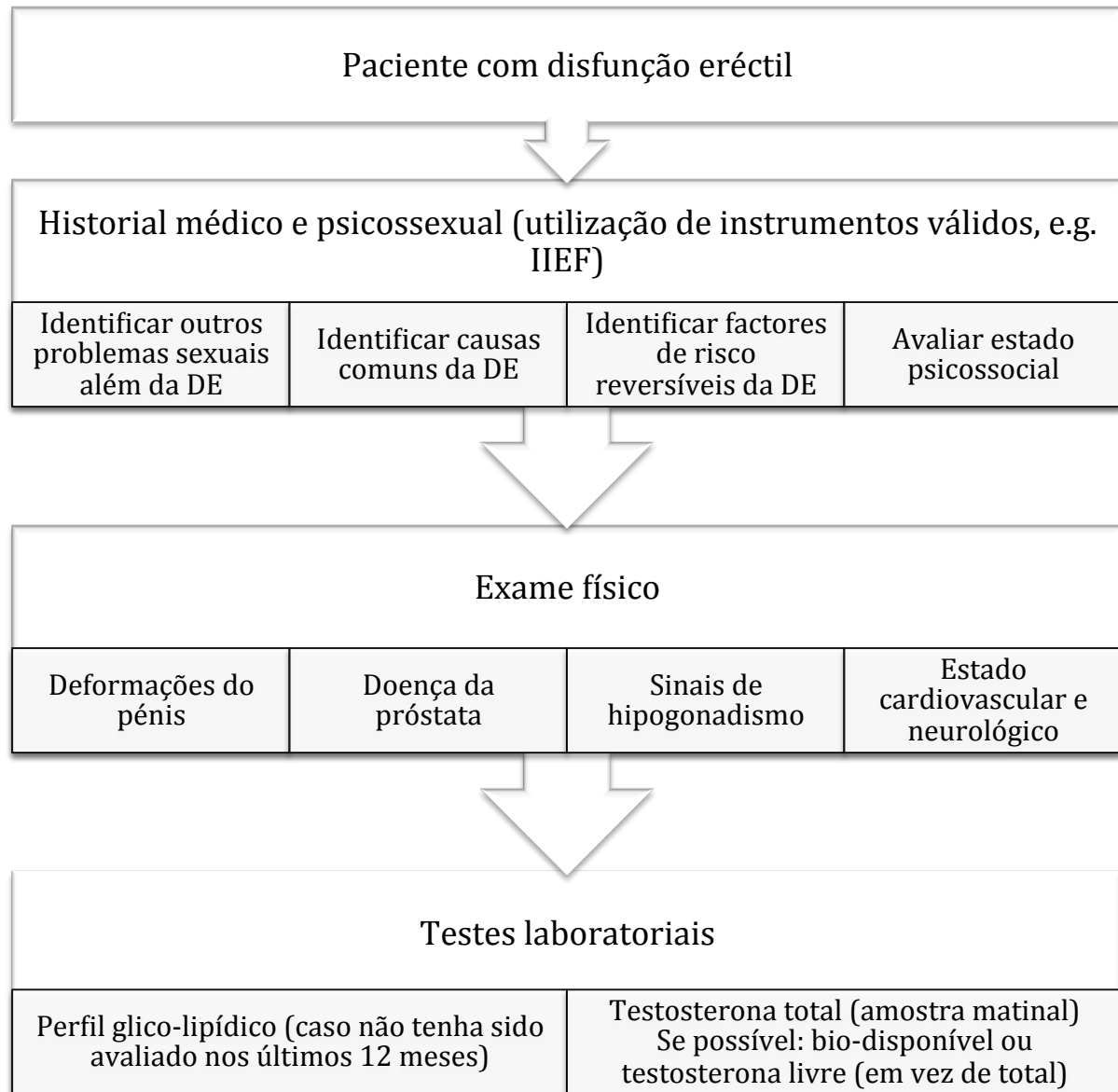


Figura 7 – Diagnóstico base no acompanhamento de homens com DE
 IIEF = International Index of Erectile Function.
 (Hatzimouratidis *et al.*, 2010)

2.5.2. Exames específicos

Embora a maioria dos pacientes com DE consiga ultrapassar a situação necessitando apenas de cuidados primários, em algumas circunstâncias (Tabela 2), são necessários testes específicos de diagnóstico (Figura 8) (Hatzimouratidis *et al.*, 2010).

Os testes de tumescência do pênis nocturna e os testes de Rigiscan devem ser realizados, pelo menos, em duas noites. O mecanismo de erecção encontra-se funcional quando a rigidez do pênis é $\geq 60\%$ durante um período ≥ 10 minutos (Hatzichristou *et al.*, 1998).

A injeção intracavernosa oferece informação limitada acerca do estado vascular. Por sua vez, o teste de ultrassom duplo em artérias cavernosas oferece maiores certezas sobre o estado dos vasos (embora seja um método invasivo). Caso os valores deste teste sejam normais (fluxo arterial sistólico >30 cm/s e índice de resistência >8), os testes de arteriografia pudenda interna, cavernosometria e cavernosografia dinâmica são desnecessários, devendo estes apenas ser aplicados a potenciais candidatos de cirurgia vascular reconstrutiva (Lobo *et al.*, 2005).

Tabela 2 – Indicações para testes específicos de diagnóstico
(Hatzimouratidis *et al.*, 2010)

Homens com disfunção erétil primária (não causada por doença orgânica ou distúrbio psicogênico)
Homens jovens com história de trauma pélvico ou peritoneal
Homens com malformações no pênis (por exemplo doença de Peyronie ou curvatura congénita)
Homens com complexos psiquiátricos ou distúrbios psicosexuais
Homens com problemas endócrinos complexos
Os testes específicos podem também ser requisitados pelos indivíduos ou seus parceiros
Por razões médico-legais (implante de prótese peniana ou abusos sexuais)

Tumescência noturna e rigidez do pênis através do teste de Rigiscan

Estudos Vasculares

- Injecção intracavernosa de fármacos vaso-activos
- Ultrassom duplo em artérias cavernosas
- Cavernosometria e cavernosografia dinâmica
- Arteriografia pudenda interna

Estudos neurológicos

Estudos endócrinos

Avaliação especializada do psicodiagnóstico

Figura 8 – Testes específicos de diagnóstico (Hatzimouratidis *et al.*, 2010)

2.6. Tratamento

2.6.1. Terapêutica de primeira linha

2.6.1.1. Inibidores da Fosfodiesterase-5

A terapêutica de primeira linha é a farmacoterapia oral. A fosfodiesterase 5 (PDE5) é uma enzima que hidrolisa a guanosina monofosfato cíclica (GMP_C) do músculo liso dos corpos cavernosos do pênis. A inibição da PDE5 resulta no aumento do fluxo de sangue, provocando um relaxamento do músculo liso, vasodilatação e consequente erecção, caso exista estimulação sexual (Hatzimouratidis *et al.*, 2010; Marques, 2010).

Existem três inibidores da PDE5 disponíveis na prática clínica aprovados pela European Medicines Agency (EMA) e pela US Food and Drug Administration (FDA): Sildenafil (Viagra[®]), Vardenafil (Levitra[®]) e Tadalafil (Cialis[®]) (Hatzimouratidis *et al.*, 2010). Além destes, existe ainda o Udenafil (Zydena[®]) que está apenas licenciado pela Korean Food and

Drug Administration, estando apenas disponível, desde 2005, no mercado farmacêutico sul-coreano (Dong-A Pharmaceutical Co., 2005). No entanto, nos EUA, foram já realizados ensaios clínicos de fase II para o udenafil, decorrendo neste momento ensaios de fase III (ClinicalTrials.gov, 2009; Dong-A PharmTech Co., 2007). Por esta razão, os inibidores da PDE que se apresentam em foco nesta dissertação são apenas os três primeiros.

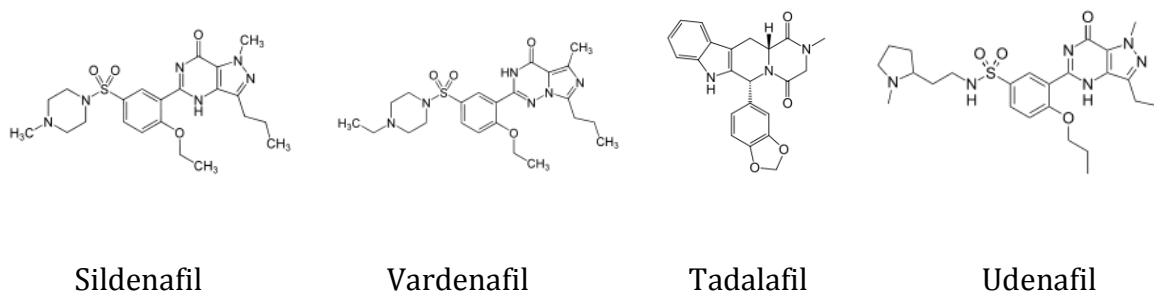


Figura 9 – Estruturas químicas dos inibidores selectivos da PDE5 actualmente utilizados na prática clínica.

Os princípios activos referidos são inibidores potentes e selectivos da PDE5 da musculatura lisa dos corpos cavernosos, responsável pela degradação do GMP_C nestes tecidos. Estes inibidores não exercem um efeito relaxante directo sobre os corpos cavernosos isolados, mas aumentam acentuadamente o efeito relaxante do NO sobre os tecidos. Quando é activada a via NO/ GMP_C , o que ocorre com a estimulação sexual, a inibição da PDE5 resulta num aumento dos níveis de GMP_C nos corpos cavernosos. Consequentemente, é necessária a estimulação sexual para que se produzam efeitos os farmacológicos esperados (Cirino *et al.*, 2006).

Foram recentemente publicados diversos artigos tendo em vista a comparação do sildenafil, vardenafil e tadalafil no tratamento da DE (Campbell, 2005; Carson, 2006; Gupta *et al.*, 2005a; Setter *et al.*, 2005; Wright, 2006). Apesar de apresentarem todos o mesmo mecanismo de acção e eficácia semelhantes, perfil de efeitos adversos e contra-indicações, existem algumas diferenças que podem influenciar a sua prescrição (Campbell, 2005; Carson, 2006; Gupta *et al.*, 2005a; Setter *et al.*, 2005; Wright, 2006).

O sildenafil, lançado em 1998, foi o primeiro inibidor da PDE5 a ser inserido no mercado, encontrando-se disponível nas dosagem de 25, 50 e 100 mg. É de todos o mais experimentado e o que possui informação mais robusta confirmando a sua segurança e tolerabilidade (Hatzimouratidis *et al.*, 2010). Para além da disfunção erétil, é o único que já obteve autorização para o tratamento da hipertensão pulmonar (Revatio[®], comprimido para administração oral, doseado a 20 mg) (Aizawa *et al.*, 2006; Corbin *et al.*, 2005; Michelakis *et al.*, 2003).

O vardenafil, lançado em 2003, é a molécula bioquimicamente mais potente (as CI_{50} para a PDE5 são 0,96 nM para o sildenafil, 0,16 nM para o vardenafil e 0,94 nM para o tadalafil) e revelou-se eficaz no tratamento de alguns homens com disfunção erétil severa e em alguns doentes em que o sildenafil foi ineficaz (Blount *et al.*, 2004; Carson, 2006; Wright, 2006). É administrado em doses de 5, 10 ou 20 mg, devendo iniciar o tratamento com a dosagem mais baixa para avaliar a resposta e os efeitos adversos (Hatzimouratidis *et al.*, 2010).

O tadalafil, lançado em 2002, apresenta a mais longa duração de acção (até 36 horas, o que se deve ao maior tempo de semi-vida, 17,5 h, quando comparado com as 4 h do sildenafil e vardenafil), o que pode constituir tanto uma vantagem (maior espontaneidade sexual), como uma desvantagem (maior exposição ao fármaco e efeitos adversos retardados) (Campbell, 2005). De facto, as diferenças no tempo de semi-vida reflectem-se no horário de administração recomendado: 30 a 60 minutos antes do acto sexual no caso do sildenafil e do vardenafil e 30 minutos a 12 horas no caso do tadalafil (Carmona *et al.*, 2010). O tadalafil encontra-se disponível nas dosagens de 2,5, 5, 10 e 20 mg e também apresentou eficácia na disfunção erétil severa e de diferentes etiologias (Carson, 2006; Hatzimouratidis *et al.*, 2010).

Outra diferença diz respeito à interacção com os alimentos, especialmente as gorduras, que afectam o perfil farmacocinético do sildenafil e vardenafil (diminuição da velocidade de absorção e aumento do tempo necessário para o início de acção), mas não do tadalafil (Hatzimouratidis *et al.*, 2010; Wright, 2006). No que respeita ao início de acção do medicamento, medido pelo tempo necessário para atingir uma erecção eficaz após a administração, encontram-se descritos os seguintes resultados: 14 minutos para 35% dos doentes tratados com sildenafil (Padma-Nathan *et al.*, 2003), 10 minutos para 21% dos doentes tratados com vardenafil (Montorsi *et al.*, 2004c) e 16 minutos para 16% dos doentes tratados com tadalafil (Wright, 2006).

2.6.1.1.1. *Efeitos adversos*

Os efeitos adversos mais comuns (Tabela 3) incluem cefaleia, rubor facial, dispepsia e congestão nasal (Green *et al.*, 2011). Ao sildenafil e vardenafil também estão associadas alterações na visão, enquanto que o tadalafil pode estar ligado a episódios de lombalgia e mialgia (Hatzimouratidis *et al.*, 2010).

Tabela 3 – Efeitos adversos comuns dos três inibidores da PDE5
(Hatzimouratidis *et al.*, 2010)

Efeito Adverso	Sildenafil	Vardenafil	Tadalafil
Cefaleia	12,8%	16%	14,5%
Rubor facial	10,4%	12%	4,1%
Dispepsia	4,6%	4%	12,3%
Congestão Nasal	1,1%	10%	4,3%
Tonturas	1,2%	2%	2,3%
Visão alterada	1,9%	<2%	-
Lombalgia	-	-	6,5%
Mialgia	-	-	5,7%

2.6.1.1.2. *Escolha ou preferência entre os diferentes inibidores da PDE5*

A escolha entre um destes fármacos está dependente da actividade sexual (uso ocasional ou terapia regular, 2-3 vezes por semana) e da experiência pessoal do paciente (Hackett *et al.*, 2007). Um estudo demonstrou a preferência dos pacientes pelo tadalafil (71%) em detrimento do sildenafil (29%). Esta é explicada pelo tempo de semi-vida bastante superior do tadalafil em relação ao sildenafil, permitindo ao paciente ter uma erecção bastante tempo depois de tomar o fármaco (Eardley *et al.*, 2005). Outro estudo opôs o vardenafil ao sildenafil, revelando a preferência dos pacientes pelo vardenafil (38,9%) em relação ao sildenafil (34,5%) (Rubio-Aurioles *et al.*, 2006). Ao comparar os três inibidores da PDE5, o tadalafil revelou, mais uma vez, ser o preferido (52%), apresentando-se seguidamente o sildenafil (28%) e, por último, o vardenafil (20%). De notar que a eficácia revelou ser semelhante em todos eles (Tolra *et al.*, 2006).

2.6.1.1.3. Segurança dos inibidores da PDE5 e interações medicamentosas

Segurança Cardiovascular

Tanto em ensaios clínicos, como nos dados pós-comercialização de sildenafil, vardenafil e tadalafil, não foram demonstrados quaisquer aumentos nas taxas de enfarte do miocárdio. Nenhum dos inibidores da PDE5 apresentou um efeito adverso constante nem provocaram alterações do tempo de isquémia durante o teste ergométrico em homens com angina estável (Kloner, 2004; Thadani *et al.*, 2002). De facto, os homens que realizaram estes testes tiveram um rendimento superior, não sendo alterada a contractilidade cardíaca (Hatzimouratidis *et al.*, 2010).

Nitratos

A administração concomitante de nitratos com qualquer um dos inibidores da PDE5 está absolutamente contra-indicada. Esta interacção provoca uma acumulação de GMP_C e sintomas de hipotensão. A duração das interacções depende do tipo de nitrato e de inibidor da PDE5 usados (Hatzimouratidis *et al.*, 2010).

Interacções com bloqueadores alfa

Todos os inibidores da PDE5 apresentam alguma interacção com os bloqueadores alfa, podendo causar hipotensão ortostática (Hatzimouratidis *et al.*, 2010). O RCM do sildenafil apresenta uma nota desaconselhando a toma de 50 ou 100 mg de sildenafil 4 horas antes ou depois de tomar um bloqueador alfa. Apesar da administração de vardenafil concomitantemente com bloqueadores alfa ser contra-indicada, a tansulosina (bloqueador adrenérgico α -1 indicado em caso de hiperplasia benigna da próstata) não se encontra clinicamente associada à hipotensão (Vardi *et al.*, 2003). O tadalafil também é contra-indicado em pacientes que estejam a tomar bloqueadores alfa, excepto se for tansulosina 0,4 mg (Auerbach *et al.*, 2004).

Ajuste da dose

Qualquer fármaco que iniba o CYP3A4 inibe também o processo metabólico dos inibidores da PDE5. Neste grupo incluem-se cetoconazol, itraconazol, eritromicina, claritromicina,

ritonavir e saquinavir. Deste modo, a dose de inibidores da PDE5 deve ser diminuída nestes casos. Por outro lado, alguns fármacos como a rifampicina, fenobarbital, fenitoína e carbamazepina, podem induzir o CYP3A4, sendo necessária uma maior dose de inibidor da PDE5 para produzir efeito. Além disso, dano hepático ou renal também podem fazer com que seja necessário o ajuste da dose (Hatzimouratidis *et al.*, 2010).

2.6.1.1.4. Ausência de resposta terapêutica a inibidores da PDE5

A ausência de resposta terapêutica a inibidores da PDE5 pode estar ligada a duas razões principais: o uso incorrecto do fármaco ou a sua ineficácia. Os profissionais de saúde devem verificar se o fármaco é licenciado, se a dose prescrita é adequada e se o fármaco é tomado de forma correcta (verificar se há estimulação sexual adequada e se há tempo suficiente entre a toma e o início da estimulação sexual). Desta forma, a resposta a inibidores da PDE5 poderá ser restabelecida e até melhorada de várias formas, como através do tratamento de hipogonadismo ou da alteração para outro inibidor da PDE5 (Hatzimouratidis *et al.*, 2010).

2.6.1.2. Dispositivos de vácuo

Os dispositivos de vácuo aplicam uma pressão negativa nos corpos cavernosos do pénis, que se mantém erecto através da aplicação de um anel de constrição exterior. Através deste dispositivo é possível obter uma erecção satisfatória para a prática sexual (na ordem dos 90%) e a taxa de satisfação pode ir dos 27% aos 94% (Levine *et al.*, 2001). Os homens com uma parceira motivada, interessada e compreensiva apresentam graus de satisfação maior. O uso prolongado de dispositivos de vácuo decresce 50-64% após 2 anos (Cookson *et al.*, 1993). A maioria dos homens que descontinua o uso de dispositivos de vácuo fá-lo nos primeiros 3 meses. Alguns dos efeitos adversos incluem dor peniana, ejaculação retardada, petéquias, hematomas e dormência, que ocorrem em menos de 30% dos pacientes (Lewis *et al.*, 1997).

2.6.2. Terapêutica de segunda linha

2.6.2.1. Injecção intracavernosa

Para pacientes que não respondem à terapêutica de primeira linha existem outras opções, como a injecção intracavernosa, que apresenta uma taxa de sucesso elevada (Levine *et al.*, 2001).

O alprostadil (Caverject™, Edex/Virial™) é o único fármaco aprovado para este tipo de tratamento (Leungwattanakij *et al.*, 2001). Esta é a opção mais eficaz de tratamento intracavernoso em doses de 5-40 µg. A erecção ocorre após 5-15 minutos e a sua duração é dependente da dose injectada. O paciente deve ser instruído acerca do processo correcto para administrar a injecção.

A taxa de eficácia da injecção de alprostadil intracavernosa é superior a 70%, com existência de acto sexual após 94% das injecções e apresenta uma taxa de satisfação de 87-93,5% dos pacientes e 86-90,3% das parceiras (Heaton *et al.*, 2001; Linet *et al.*, 1996; Porst, 1996). As complicações que podem advir desta terapia incluem dor peniana (50% dos pacientes após 11% das injecções), erecções prolongadas (5%), priapismo (1%) e fibrose (2%) (Lakin *et al.*, 1990).

2.6.2.2. Combinação terapêutica

A combinação terapêutica é uma forma de diminuir os efeitos adversos ao usar uma dose mais baixa de cada fármaco. A administração concomitante de papaverina, fentolamina e alprostadil foi a combinação com maior taxa de eficácia, atingindo os 92%. Apesar dos efeitos secundários serem semelhantes à monoterapia com alprostadil, esta combinação tem a vantagem de provocar menor dor peniana (Hatzimouratidis *et al.*, 2010).

Caso a erecção seja demasiado prolongada, o paciente deve consultar um médico, de modo a evitar danos no tecido cavernoso que podem impossibilitar, de forma permanente, a erecção. Se esta situação acontecer, o sangue deve ser aspirado dos corpos cavernosos para diminuir a sua pressão. Esta técnica, além de simples, é geralmente suficiente para restabelecer a flacidez do pénis (Porst, 1996).

2.6.2.3. Terapêutica intra-uretral

Ainda dentro da terapêutica de segunda linha, existe uma formulação específica de alprostadil (prostaglandina E1) que pode ser administrada de forma intra-uretral (MUSE® - introduzido sob a forma de um pequeno comprimido de absorção rápida). A interação vascular entre a uretra e os corpos cavernosos ajuda a transferir o fármaco entre estas estruturas (Guay *et al.*, 2000; Hatzimouratidis *et al.*, 2010). A aplicação um anel de constrição (ACTIS™) pode ajudar a aumentar a eficácia (Lewis, 1998). A eficácia deste tipo de técnica é inferior à injeção intracavernosa e apresenta como efeitos adversos dor local (29-41%), tonturas (1,9-14%), fibrose e priapismo (inferiores a 1%) (Hatzimouratidis *et al.*, 2010).

2.6.3. Terapêutica de terceira linha

2.6.3.1. Próteses penianas

A implantação cirúrgica de uma prótese peniana deve ser considerada em pacientes que não obtenham resposta farmacoterapêutica ou que pretendam uma solução permanente para este problema (adequada na doença de Peyronie e priapismo). Existem dois tipos de próteses: as maleáveis (semi-rígidas) e as infláveis (com duas ou três peças). Apesar de serem bastante mais caras, a maioria dos pacientes prefere as infláveis de três peças, pois permitem a obtenção de uma erecção mais “natural” (Montague *et al.*, 2001).

As próteses penianas apresentam como vantagens a eficácia a longo termo, com elevada taxa de satisfação (70-87%); o facto de não ser necessária qualquer medicação; e uma capacidade melhorada de manter uma vida sexualmente activa (Hackett *et al.*, 2007). As duas maiores complicações são as falhas mecânicas e as infecções (Montorsi *et al.*, 2000). As infecções podem ser diminuídas caso a técnica cirúrgica seja cuidadosa e através de profilaxia com antibiótico contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (taxa de infecção reduzida para 2-3%). Em último caso, as infecções podem provocar a necessidade de remoção da prótese, seguida de antibioterapia. A implantação de uma nova prótese só deverá ser efectuada 6-12 meses após tratamento da infecção. A implantação de uma prótese peniana é, deste modo, uma solução para pacientes que não obtenham resposta à terapia farmacológica. (Montorsi *et al.*, 2004b; Mulcahy, 2000).

3. Fertilidade Masculina

3.1. Causas externas de infertilidade

A infertilidade atinge cerca de 13-18% (Iammarrone *et al.*, 2003) dos casais. Estudos clínicos e epidemiológicos mostram uma incidência crescente do factor masculino, que está envolvido em cerca de metade dos casos (Brugh *et al.*, 2003). As causas de infertilidade masculina podem ser genéticas, endócrinas, imunológicas e ambientais, sendo que estas últimas assumem particular relevância nos dias de hoje (Parada *et al.*, 2004).

As alterações causadas pelos agentes ambientais podem incluir toxicidade reprodutiva, com alterações da fertilidade e toxicidade no desenvolvimento do organismo, provocado pela agressão em fases diversas, desde a exposição prévia à concepção por um dos progenitores, durante o desenvolvimento pré-natal até à fase de maturação sexual. O processo de espermatogénese, abordado anteriormente, bem como o controlo do eixo hipotálamo-hipofisário e das hormonas testiculares, podem ser afectados por factores externos (Parada *et al.*, 2004).

Os agentes químicos podem lesar a espermatogénese, desde a espermatogónia até ao espermatozóide por três efeitos tóxicos, não exclusivos entre si: morte celular, por necrose ou apoptose; lesão celular sub-letal; e alterações genéticas (Parada *et al.*, 2004).

A secreção de androgénios e a produção de espermatozóides férteis pode ser afectada por diferentes mecanismos, podendo a toxicidade da função testicular ser dividida em três níveis:

Toxicidade pré-testicular – inclui perturbações na secreção fisiológica das hormonas hipofisárias FSH e LH, resultado na falência testicular (Parada *et al.*, 2004).

Toxicidade testicular – pode afectar vários tipos celulares, incluindo células de Leydig, células de Sertoli e as células germinativas. Por se desenvolverem na periferia das células de Sertoli, as espermatogónias são as células mais afectadas, uma vez que não se encontram protegidas pela barreira protectora hemato-testicular (Parada *et al.*, 2004).

Toxicidade pós-testicular – este tipo de toxicidade é incomum mas pode ser provocada por fármacos adrenolíticos que podem afectar a estrutura neuromuscular dos epidídimos,

condicionando estase do espermatozoides nos epidídimos. Daí pode resultar uma perda completa da motilidade e consequente esterilidade (Parada *et al.*, 2004).

3.1.1. Agentes físicos

Um dos agentes físicos que influenciam a fertilidade é a temperatura escrotal. Parece haver uma relação entre a elevação da temperatura escrotal e a redução dos parâmetros seminais. Esta relação não se encontra ainda devidamente fundamentada mas há estudos onde esta associação é significativa (Parada *et al.*, 2004).

Os efeitos anti-espermatogénicos das radiações ionizantes são bem evidentes em tecido tão sensíveis como os testículos. Estas radiações são outro agente físico que pode provocar alterações cromossómicas, levando a alterações na qualidade do espermatozoides como a diminuição da motilidade, modificações estruturais, morte celular ou transmissão de alterações citogenéticas (Parada *et al.*, 2004).

As radiações não-ionizantes geradas por equipamentos domésticos (microondas, rádio, televisão) parecem não causar qualquer efeito na espermatogénese. No entanto, os telemóveis, que podem gerar campos magnéticos de intensidade moderada e elevada frequência, constituem um motivo de preocupação (Parada *et al.*, 2004).

A exposição a ruídos e vibrações pode provocar uma secreção de hormonas do córtex supra-renal, como resposta fisiológica ao stress, podendo condicionar alterações na libertação de gonadotropinas (Parada *et al.*, 2004).

3.1.2. Agentes químicos

Os pesticidas são agentes químicos que podem ser bastante tóxicos para o sistema reprodutor masculino. Um exemplo disso é o dibromocloropropano (largamente usado na década de 70) que provoca aumento dos níveis de FSH e LH, levando à diminuição do número de espermatozoides no ejaculado. Metais, como o chumbo, levam à diminuição da fertilidade por efeito directo nos testículos, associado a uma acção no eixo hipotálamo-hipofisário. O mesmo acontece com o álcool e algumas drogas que também influenciam a acção do sistema reprodutor ao inibirem a secreção de LH. Os éteres de glicol, solvente orgânico presente nas tintas, e o benzeno, parecem afectar o desenvolvimento de espermátocitos e de

espermatozóias, merecendo especial atenção por parte de quem lida com estes compostos diariamente. Os agentes citotóxicos e o tabaco têm uma acção nefasta na espermatogénese, pois podem causar lesões no ADN das células germinativas (Parada *et al.*, 2004).

3.2. Análise laboratorial do esperma humano

Durante a ejaculação, o esperma é produzido a partir de uma determinada concentração de espermatozóides, armazenados nos epidídimos, que são diluídos com secreções provenientes das glândulas sexuais acessórias. Estima-se que cerca de 90% do volume do esperma é constituído por secreções provenientes dos órgãos acessórios (principalmente da próstata e das vesículas seminais) (Cooper *et al.*, 2005).

O esperma apresenta dois atributos principais que podem ser quantificados:

- Número total de espermatozóides: reflecte a função testicular e a permeabilidade dos ductos pós-testiculares;
- Volume total de fluido: reflecte a actividade secretora das glândulas.

Além destes atributos, é necessário ter em conta que, a natureza do espermatozóide (vitalidade, motilidade e morfologia) e a composição do líquido seminal, são também importantes na avaliação funcional do esperma (Cooper *et al.*, 2005).

3.2.1. Análise macroscópica

A análise do esperma deve ser feita, preferencialmente, até 30 minutos após a ejaculação para prevenir a desidratação ou alterações de temperatura que possam afectar a qualidade do sémen. A análise deve iniciar-se com uma simples inspecção da liquefacção, seguido da observação da sua viscosidade. O aspecto do ejaculado liquefeito normal é homogéneo, com uma coloração cinzenta-opaca (Cooper *et al.*, 2005).

Como referido anteriormente, o volume de ejaculado é maioritariamente proveniente das vesículas seminais e da próstata, vindo apenas uma pequena porção das glândulas de Cowper e dos epidídimos. A medição exacta do volume é essencial para permitir o cálculo do número total de espermatozóides e das restantes células do ejaculado. Como valor de referência, o

limite mínimo de volume de esperma é de 1,5 ml. A análise da viscosidade é também importante pois esta pode interferir com a determinação da motilidade, concentração, detecção de anticorpos anti-espermatozóide e marcadores bioquímicos do esperma (Cooper *et al.*, 2005).

O pH do esperma reflecte o equilíbrio entre os valores de pH das secreções das diferentes glândulas. A secreção que provém das vesículas seminais é alcalina, enquanto a que vem da próstata é ácida. A medição do pH deve ser efectuada após liquefacção, de preferência passados 30 minutos. Apesar de não existirem valores de referência para o pH do sémen de um homem fértil, o limiar inferior que deve ser tido em conta é de 7,2 (Cooper *et al.*, 2005).

3.2.2. Análise microscópica

Segundo a OMS (Cooper *et al.*, 2005), o microscópio aconselhado para este tipo de análise é o de contraste de fase. A observação inicial da amostra deve ser efectuada com uma ampliação total de x100, revelando:

- Formação de filamentos de muco;
- Agregação ou aglutinação de espermatozóides;
- Presença de outras células além dos espermatozóides, como células epiteliais, leucócitos, células germinativas imaturas e partes isoladas do espermatozóide (cabeças, caudas).

Posteriormente, a preparação deve ser observada novamente com uma ampliação de x200 ou x400, de modo a:

- Avaliar a motilidade espermática;
- Determinar a diluição necessária para a avaliação precisa do número de espermatozóides.

A concentração de espermatozóides no esperma é extremamente importante para poder calcular o número de espermatozóides presentes no ejaculado. A concentração refere-se ao número de espermatozóides por unidade de volume de esperma e o seu limite inferior de referência é de 15×10^6 espermatozóides por mililitro.

O número total de espermatozóides por ejaculado é, então, calculado a partir da concentração de espermatozóides, multiplicada pelo volume de esperma. O valor de referência para este parâmetro é de 39×10^6 espermatozóides por ejaculado.

3.2.2.1. Motilidade do espermatozóide

A motilidade do espermatozóide está totalmente relacionada com as taxas de gravidez (Jouannet *et al.*, 1988; Zinaman *et al.*, 2000). Esta motilidade pode ser dividida em três categorias que a caracterizam:

- Motilidade progressiva (PR): os espermatozóides movem-se activamente, em linha recta ou em círculos largos, independentemente da velocidade;
- Motilidade não progressiva (NP): os espermatozóides apresentam qualquer outro tipo de movimento mas, sem progressão (e.g., o espermatozóide movimenta-se em pequenos círculos ou o flagelo dificilmente consegue provocar movimento da cabeça do espermatozóide);
- Imobilidade (IM): ausência de movimento.

O limite inferior para a motilidade total (PR+NP) deve ser de 40%, sendo que 32% devem apresentar motilidade progressiva (PR) (Cooper *et al.*, 2005).

3.2.2.2. Vitalidade do espermatozóide

A vitalidade do espermatozóide consiste em avaliar a integridade da membrana celular, merecendo especial atenção os casos em que a motilidade total se encontra inferior a 40%. Os espermatozóides vivos são identificados por apresentarem uma membrana intacta e as células mortas não devem exceder a percentagem de espermatozóides imóveis (Cooper *et al.*, 2005).

Neste tipo de teste, é feita uma coloração com eosina-nigrosina, reagentes estes que permitem facilmente distinguir o estado de integridade da membrana. Em alternativa, também existe o teste *Hypo-osmotic swelling test*, muito útil quando se pretende manter intacta a integridade do espermatozóide (e.g., escolha de um espermatozóide para injeção intra-citoplasmática de espermatozóide - ICSI). O limite inferior de referência para a vitalidade (espermatozóides com a membrana intacta) é de 58% (Cooper *et al.*, 2005).

3.2.2.3. Morfologia do espermatozóide

O espermato humano contém espermatozoides com morfologia normal (já explicada anteriormente), mas também possui espermatozoides com diferentes tipos de malformações (Figura 10). Dependendo do tipo de malformação, os espermatozoides anormais têm, geralmente, menor potencial de fecundação e, por vezes, até apresentam ADN danificado. A parte na qual recai maior atenção é a forma da cabeça (por ser o local que contém o ADN), no entanto, a peça intermédia e a cauda também se revelam bastante importantes.

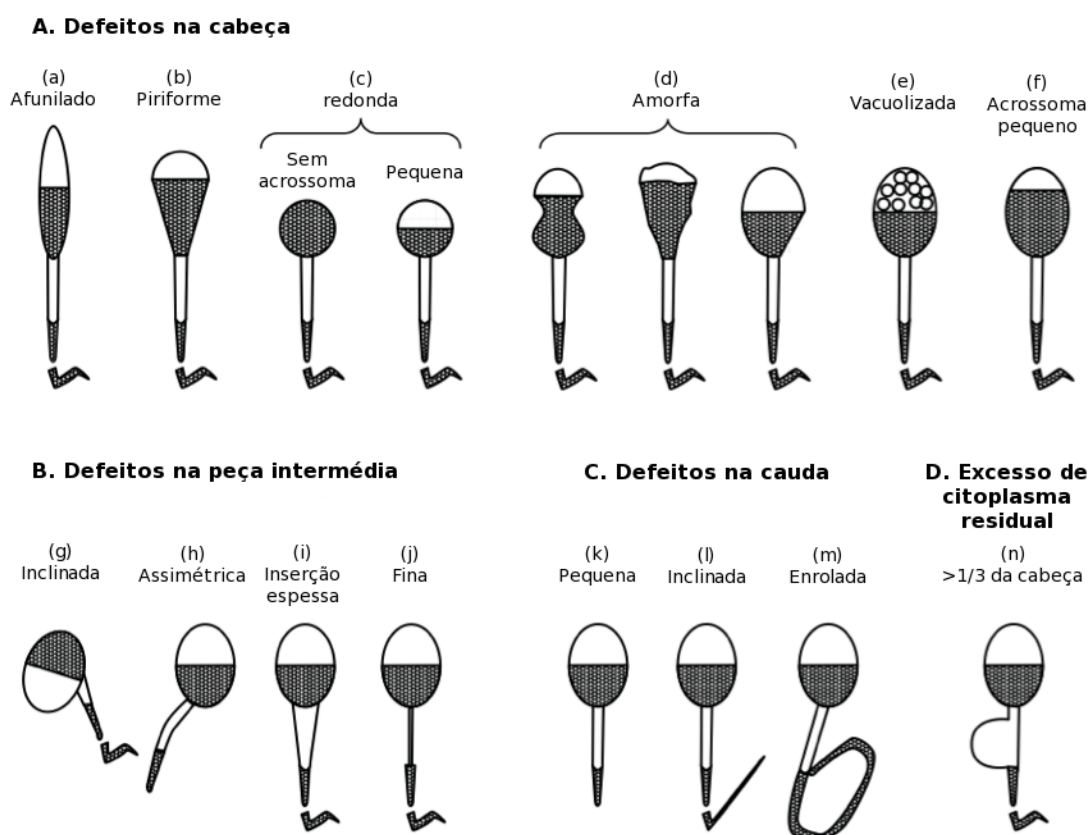


Figura 10 – Formas anormais de espermatozoides humanos (Cooper *et al.*, 2005)

O valor mínimo para espermatozoides com morfologia normal é de 4% (Cooper *et al.*, 2005).

3.2.2.4. Avaliação de leucócitos no espermato

Os leucócitos são muitas vezes encontrados no ejaculado. Estes podem ser facilmente confundidos com espermátides multinucleares mas, através de coloração e do tamanho do núcleo, podem ser distinguidos. No entanto, o teste de avaliação da actividade das

peroxidases é uma técnica de rotina muito útil para quantificar a população de leucócitos, uma vez que os granulócitos peroxidase-positivos são os leucócitos mais predominantes no esperma. De acordo com os valores de referência da OMS, o limite superior é de 1×10^6 leucócitos peroxidase-positivos por mililitro (Cooper *et al.*, 2005).

3.2.2.5. Avaliação de anticorpos no esperma

Se os espermatozóides demonstrarem alguma aglutinação, esta pode ser causada por anticorpos presentes no esperma. Os anticorpos anti-espermatozóides presentes no esperma devem-se, quase exclusivamente, a duas classes de imunoglobulinas: IgA e IgG. No entanto, existem testes que permitem identificar estes anticorpos presentes no esperma: o teste MAR (mixed antiglobulin reaction) e o teste IB (immunobead). Estes testes permitem calcular o número de espermatozóides com marcadores aderentes (os marcadores ligam-se aos anticorpos). O número de espermatozóides móveis com marcadores deve ser inferior a 50% para os dois tipos de teste (Cooper *et al.*, 2005).

3.2.2.6. Testes opcionais

Além de toda esta análise laboratorial *standard*, existem ainda testes opcionais que permitem avaliar a capacidade de secreção da próstata (zinco, ácido cítrico, γ -glutamyl transpeptidase e fosfatase ácida), das vesículas seminais (fructose) e dos epidídimos (l-carnitina, glicerofofocolina e alfa glucosidase neutra), que já demonstraram ter um papel extremamente fundamental na função reprodutora masculina (Cooper *et al.*, 2005).

3.2.3. Classificação da qualidade do esperma

Após a análise macroscópica e microscópica do esperma, é possível classificar o esperma de acordo com as características que apresenta. A nomenclatura apresentada na figura 11 demonstra a classificação atribuída à qualidade do esperma (Cooper *et al.*, 2005).

Normozoospermia	•Ejaculado normal
Oligozoospermia	•Número/concentração de espermatozóides abaixo do valor de referência
Astenozoospermia	•Percentagem de espermatozóides com motilidade progressiva abaixo dos valores de referência
Necrozoospermia	•Baixa percentagem de espermatozóides vivos e elevada de imóveis
Teratozoospermia	•Percentagem de espermatozóides com morfologia normal abaixo dos valores de referência
Azoospermia	•Ausência de espermatozóides no ejaculado
Aspermia	•Ausência de ejaculado

Figura 11 – Nomenclatura relacionada com a qualidade do esperma (Cooper *et al.*, 2005)

Tabela 3 – Valores de referência para as características do esperma (Cooper *et al.*, 2005)

Parâmetros	Limite inferior de referência
Volume de esperma (ml)	1,5
Número total de espermatozóides (10^6 por ejaculado)	39
Concentração do esperma (10^6 por ml)	15
Motilidade total (PR + NP, %)	40
Motilidade progressiva (PR, %)	32
Vitalidade (espermatozóides vivos, %)	58
Morfologia do esperma (formas normais, %)	4
Outros Valores	
pH	$\geq 7,2$
Leucócitos peroxidase-positivos (10^6 por ml)	$< 1,0$
Teste MAR (espermatozóides móveis com marcador, %)	< 50
Teste IB (espermatozóides móveis com marcador, %)	< 50
Zinco (μmol /ejaculado)	$\geq 2,4$
Fructose (μmol /ejaculado)	≥ 13
Alfa-glucosidase neutra (mU/ejaculado)	≥ 20

4. Mecanismo de acção dos inibidores da fosfodiesterase 5

4.1. Sistemas de segundo mensageiro

Os receptores membranares transmitem informações a partir do exterior da célula para o seu interior. Por vezes, para que este processo ocorra, é necessário que haja sistemas de segundo mensageiro pois algumas moléculas não atravessam a membrana, por serem muito grandes e polares (Stryer *et al.*, 2001).

Os sistemas de segundo mensageiro são um grupo de elementos intracelulares independentes que se relacionam entre si. Os segundos mensageiros geram um sinal intracelular como resposta a um primeiro mensageiro extracelular (e.g., hormonas e neurotransmissores). Pensa-se que os mecanismos de segundo mensageiro actuam em vários processos celulares do metabolismo, secreção ou crescimento celular. Como referido anteriormente, a molécula de sinal primário não entra na célula mas usa uma cascata de eventos moleculares de modo a induzir a resposta celular, podendo uma simples molécula despoletar uma grande resposta intracelular (Dimitriadis *et al.*, 2008; Stryer *et al.*, 2001).

Existem 4 classes de mecanismos de segundo mensageiro:

- a) Mecanismo da tirosina cinase;
- b) Mecanismo do inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃)/diacilglicerol (DAG);
- c) Iões cálcio (Ca²⁺);
- d) Nucleótidos cíclicos (e.g., 3',5'-adenosina monofosfato cíclico [AMP_c] e 3',5'-guanosina monofosfato cíclico [GMP_c]).

O sistema do segundo mensageiro abrange vários elementos incluindo o primeiro mensageiro, o receptor do mensageiro primário, um segundo receptor chamado proteína G (que interage com o receptor do mensageiro primário), um enzima que é activado pela dupla interação de receptores e uma molécula segundo mensageiro gerado por este enzima. O sinal intracelular gerado em resposta ao primeiro mensageiro é amplificado na célula (Dimitriadis *et al.*, 2008).

4.1.1. Mecanismo de segundo mensageiro tirosina cinase

Factores de crescimentos como a insulina, o factor de crescimento epidérmico (EGF) e o factor de crescimento derivado das plaquetas são exemplos de moléculas das quais o receptor é a tirosina cinase. Estas moléculas ligam-se a domínios expostos na superfície celular resultando numa mudança conformacional que activa os domínios da cinase localizados na região citoplasmática do receptor (Dimitriadis *et al.*, 2008; Stryer *et al.*, 2001). Em alguns casos, o receptor fosforila-se a si próprio como parte do processo de activação da cinase. O receptor activado fosforila uma variedade de alvos intracelulares, a maioria deles são enzimas que se tornam activos ou inactivos após fosforilação (Dimitriadis *et al.*, 2008).

4.1.2. Mecanismo de segundo mensageiro DAG/proteína cinase C (PKC)

O sistema DAG/PKC é um mecanismo de segundo mensageiro para primeiros mensageiros como a hormona estimulante da tiroide (TSH), da angiotensina ou de neurotransmissores e que fosforila a serina e a treonina em muitas proteínas (Dimitriadis *et al.*, 2008; Stryer *et al.*, 2001). Os primeiros mensageiros descritos acima ligam-se aos receptores da proteína G acoplada e, conseqüentemente, a subunidade alfa da proteína G activa um enzima intracelular chamado fosfolipase C. Este enzima hidrolisa o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) que se encontra na camada interna da membrana plasmática. Os produtos da hidrólise são o DAG e o IP₃. Após hidrólise, o DAG permanece na camada interna da membrana plasmática devido às suas propriedades hidrofóbicas e o IP₃ vai disponibilizar as ligações de cálcio que a PKC necessita para ser activada. O IP₃ é uma molécula solúvel que se difunde pelo citosol e se liga a receptores no retículo endoplasmático liso, libertando Ca²⁺ para o citosol. É este aumento de cálcio intracelular que provoca a resposta celular (Figura 11).

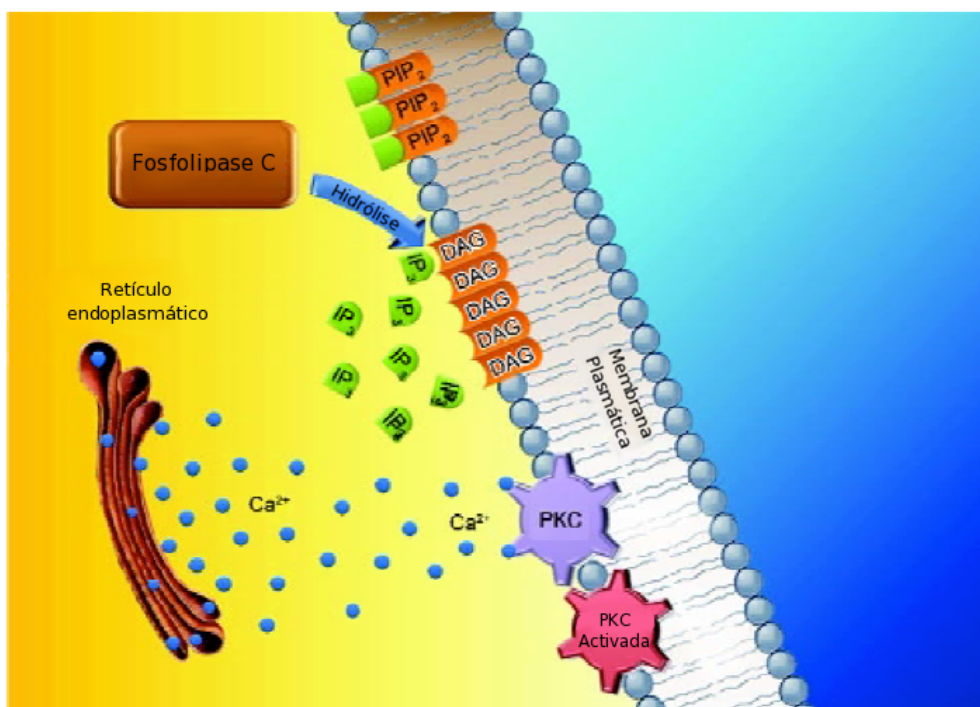


Figura 12 – Mecanismos de segundo mensageiro intracelular (Dimitriadis *et al.*, 2008)

4.1.3. Iões cálcio (Ca^{2+})

O Ca^{2+} é o mensageiro intracelular mais importante. Como resposta a vários sinais primários, o aumento da concentração de Ca^{2+} desencadeia um grande número de eventos como a contracção muscular, a libertação de neurotransmissores nas sinapses, a secreção de hormonas como a insulina, a activação de células T e B, apoptose, entre outros (Dimitriadis *et al.*, 2008). Isto acontece porque o cálcio é um componente importante em vários mecanismos de transdução de sinal, e.g., o Ca^{2+} activa a calmodulina, proteína reguladora de muitos enzimas e transportadores. Além disso, a sua capacidade para se ligar a múltiplos ligandos permite uma interacção com diferentes segmentos de uma proteína e a indução de alterações conformacionais (Dimitriadis *et al.*, 2008; Stryer *et al.*, 2001).

4.1.4. Mecanismo de segundo mensageiro adenilato ciclase (AC)/AMP_C

O AMP_C é um nucleótido gerado a partir do ATP pela acção do enzima adenilato ciclase. Uma grande variedade de hormonas pode desencadear um aumento ou diminuição intracelular da concentração de AMP_C. Uma concentração elevada de AMP_C pode activar a

proteína cinase dependente de AMP_C chamada proteína cinase A (PKA). Esta proteína encontra-se num estado catalítico inactivo mas torna-se activa quando se liga ao AMP_C.

O AMP cíclico foi descoberto em 1958 (Rall *et al.*, 1958) e, desde então, muitos mecanismos bioquímicos foram atribuídos a esta molécula como a estimulação da degradação do glicogénio, a gluconeogenese, a degradação lipídica, a síntese de esteróides, a inibição da síntese de glicogénio, a absorção de aminoácidos e a regulação do transporte de iões bem como a regulação e transcrição. É formado pela acção da AC no complexo ATP-Mg²⁺, sendo necessário Mg²⁺ livre como cofactor. Além disso, há mais duas proteínas envolvidas no mecanismo de transdução de sinal dependente de AMP_C: um receptor hormonal e uma proteína G (heterodímero). A associação desta proteína com os receptores da AC pode provocar a sua estimulação ou inibição (caso a proteína G seja do tipo G_s ou G_i, respectivamente). O AMP_C que se forma activa a proteína cinase dependente de AMP_C (PKA) que está envolvida em algumas vias metabólicas, fosforilando outras proteínas (enzimas, transportadores, etc.).

Hormonas como a adrenalina, glucagon e a gonadotrofina LH, produzem o seu efeito através do AMP_C como segundo mensageiro. Estas hormonas ligam-se aos seus receptores na membrana das células alvo interagindo com determinadas proteínas G. Esta interacção estimula a AC a iniciar a conversão do ATP em AMP_C. Quando o AMP_C activa a PKA desenrola uma cascata de eventos na célula, disponibilizando fosfato para outros enzimas, alterando a sua estrutura e, conseqüentemente, alterando a sua actividade catalítica.

4.1.5. Mecanismo de segundo mensageiro GC/GMP_C

A descrição dos nucleótidos cíclicos AMP_C e GMP_C levaram ao aparecimento do primeiro conceito de segundo mensageiro. Muito semelhante ao AMP_C, o GMP_C é um segundo mensageiro importante. Foi descrito como um produto biológico em 1963 mas a regulação da sua síntese permaneceu desconhecida durante muitos anos. A sua concentração nos tecidos é relativamente baixa. Esta foi a principal razão pela qual o GMP_C não foi considerado como um potencial segundo mensageiro durante vários anos. Posteriormente, tornou-se evidente que o GMP_C tem um papel importante no controlo de uma grande variedade de processos biológicos tais como a fototransdução da retina, secreção intestinal, relaxamento do músculo liso, activação plaquetar e neurotransmissão (Hurley, 1998). O GMP_C é obtido a partir do GTP por uma reacção catalisada pelos enzimas GC que estão expressos tanto na isoforma

solúvel (GC_s) como na isoforma ligada à membrana (GC_m). Estas isoformas coexistem na maioria das células em concentrações diferentes dependendo no tipo de tecido e do seu estado fisiológico (Waldman *et al.*, 1987). O GC_m é um enzima que se encontra na superfície celular e contém um receptor extracelular e um domínio intracelular catalítico, separados por um domínio transmembranar único (Denninger *et al.*, 1999).

Até agora, foram identificadas algumas subclasses de GC_m em vertebrados. Estas são proteínas homodiméricas (Liu *et al.*, 1997) e, provavelmente, estão associadas à membrana plasmática, ao retículo endoplasmático, ao complexo de Golgi e à membrana nuclear (Waldman *et al.*, 1987).

As isoformas solúveis de guanilato ciclase GC_s incluem um grupo de hemoproteínas heterodiméricas compostas por α - e β -subunidades (Liu *et al.*, 1997). Também contém um grupo heme proteico em cada heterodímero (Denninger *et al.*, 1999) onde se podem ligar gases como o NO e o monóxido de carbono (CO) [5]. A actividade catalítica do enzima GC tem um aumento de 5 vezes, quando se liga ao CO, e de 400 vezes, quando o seu substrato é o NO (Denninger *et al.*, 1999).

4.2. AMP_C e GMP_C na regulação da função erétil

Como já referido anteriormente, a erecção requer um aumento de afluxo de sangue para o pénis, como consequência do relaxamento do músculo liso e da restrição do fluxo venoso dos corpos cavernosos. Este processo é mediado por neurónios preganglionares parassimpático-colinérgicos presentes na medula espinhal sacral (S2-4). Os nervos cavernosos surgem a partir dos nervos pélvicos que saem da região da medula espinhal sacral, mencionada anteriormente, e fornecem os elementos autonómicos para o pénis. Estes nervos libertam vários neurotransmissores incluindo óxido nítrico, acetilcolina (Ach), e péptido vasoactivo intestinal (VIP) que possibilitam o relaxamento do músculo liso dos corpos cavernosos (Moreland *et al.*, 2001). Pensa-se que a libertação de NO activa os enzimas GC citosólicos aumentando os níveis intracelulares de GMP_C e reduzindo o conteúdo de Ca^{2+} a nível citosólico. Além disso, o NO parece reduzir a libertação de norepinefrina dos nervos noradrenérgicos (Cellek *et al.*, 1997). O sistema de segundo mensageiro AC/ AMP_C está também presente na erecção peniana pois o VIP actua na via da AC para desencadear um aumento dos níveis de AMP_C intracelular (Andersson, 2001), procovando um aumento das

concentrações intracelulares de AMP_C que levam à diminuição do Ca²⁺ citosólico no músculo liso dos corpos cavernosos, provocando o relaxamento desse mesmo músculo.

4.3. Regulação da função erétil pelos sistemas de segundo mensageiro

4.3.1. Mecanismo de segundo mensageiro AC/AMP_C na função erétil

O AMP_C parece estar envolvido em vias de sinalização que regulam a motilidade do espermatozoide bem como a sua progressão (Leclerc *et al.*, 1996; Visconti *et al.*, 1995). De facto, os níveis elevados de AMP_C intracitosólico demonstraram que há uma melhoria na motilidade e viabilidade do espermatozoide (Lewis *et al.*, 1996; Rees *et al.*, 1990) por:

- aumentar a taxa de glicólise e frutólise;
- aumentar a oxidação do lactato ou piruvato a CO₂.

Yanagimachi, 1994, chegou à conclusão que a assimetria, os movimentos com elevada amplitude no flagelo do espermatozoide (motilidade hiperactiva) e o processo de progressão dos espermatozoides, são dependentes dos níveis intracelulares de AMP_C. Esta conclusão é consistente com a de MacLeod *et al.*, 1991, que demonstrou que a maioria das proteínas cinases dependentes de AMP_C presentes no espermatozoide de ratos se encontram no flagelo. Além disso, o AMP_C parece ter um papel importante no processo de progressão dos espermatozoides e na reacção acrossómica.

4.3.2. Mecanismo de segundo mensageiro GC/GMP_C na função erétil

O NO, como já referido anteriormente, é sintetizado pela NOS em muitos tipos de células de mamíferos em resposta a um grande número de estímulos. Os espermatozoides também expressam actividade da NOS e são capazes de sintetizar NO (Donnelly *et al.*, 1997; Herrero *et al.*, 1996; Revelli *et al.*, 1999). Estímulos químicos específicos podem melhorar a produção de NO por parte do espermatozoide (Donnelly *et al.*, 1997; Revelli *et al.*, 1999). A presença das isoformas NOS_e e NOS_n foi demonstrada em vários estudos (Herrero *et al.*, 1996; Revelli *et al.*, 1999). O NO é conhecido por afectar a mobilidade e a viabilidade do

esperma, sendo apenas necessária uma concentração reduzida. A doses baixas, o óxido nítrico parece melhorar ou manter a motilidade dos espermatozóides devido à estimulação da produção de GMP_C onde em elevadas concentrações, a motilidade e viabilidade são adversamente afectadas, muito pela formação de radicais livres e do dano oxidativo na membrana do espermatozóide (Rosselli *et al.*, 1995).

As substâncias que activam a GC (em particular o péptido natriuretico e o óxido nítrico), afectam positivamente a motilidade, a progressão do espermatozóide e a reactividade acrossomal. Estas substâncias estimulam o metabolismo do espermatozóide e promovem a sua aproximação ao oócito, a interacção entre ambos e a fertilização. Alguns estudos indicam que a síntese de GMP_C influencia o sucesso da reacção acrossómica do esperma (Revelli *et al.*, 2002). No espermatozóide humano existe um fenómeno complexo entre os sistemas que geram AMP_C e GMP_C e regulam a função erétil (Sofikitis *et al.*, 1993a). A espermatogénese e a interacção espermatozóide-óvulo parecem ser afectadas positivamente pela activação da GC, apesar do excesso de activadores da GC poderem provocar a acção oposta, aumentando o stress oxidativo e a peroxidação lipídica nas membranas dos espermatozóides (Rosselli *et al.*, 1995). Eventos importantes do processo de fertilização (e.g., reacção acrossómica) são regulados por sistemas de segundo mensageiro. Sofikitis *et al.* (1993a), demonstrou que há interacções entre o sistema de segundo mensageiro AC/AMP_C e o forboldiester/PKC na regulação do processo de reacção acrossómica.

4.4. Fosfodiesterases (PDEs): Considerações gerais

As PDEs têm um papel dominante na regulação dos níveis celulares de AMP_C e do GMP_C . A sua função é, em conjugação com a AC e GC, regular a amplitude e duração do mecanismo de sinalização intracelular (mediado via AMP_C e GMP_C , respectivamente). Foram identificados 21 genes do genoma humano envolvidos na codificação de PDEs. Estes genes originam um número relativamente elevado de PDEs, tendo sido identificados, no ser humano, até ao momento, 96 pautas de leitura (*open reading frames*), cada uma das quais pode, potencialmente, codificar uma fosfodiesterase (Conti *et al.*, 2007).

A análise de sequências sugere que existem pelo menos 11 famílias diferentes de PDEs em mamíferos. As diferentes isoenzimas de PDEs foram divididas em 11 famílias (PDE1-PDE11), com base na homologia sequencial, especificidade para o substrato (AMP_C e/ou GMP_C) (Figura 13), propriedades cinéticas (Tabela 4) e regulação por moduladores (Tabela

5). Aproximadamente 270 aminoácidos no domínio catalítico C-terminal são conservados, existindo uma homologia sequencial de 35% a 55% entre as diferentes famílias de PDEs.

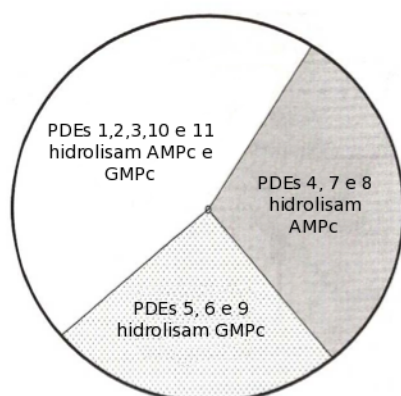


Figura 13 – Famílias de PDEs agrupadas em categorias com base na especificidade para o substrato (Beavo *et al.*, 2007)

Tabela 4 – Propriedades cinéticas das PDEs
Adaptado de (Bender *et al.*, 2006)

Isoenzima	Especificidade para o substrato	K _M		V _{máx}	
		GMPc (μM)	AMPc	GMPc (μmol/min/mg)	AMPc (μmol/min/mg)
PDE1A	GMPc>AMPc	2.6-3.5	72.7-124	50-300	70-450
PDE1B	GMPc>AMPc	1.2-5.9	10-24	30	10
PDE1C	AMPc≈GMPc	0.6-2.2	0.3-1.1	—	—
PDE2A	AMPc≈GMPc	10	30	123	120
PDE3A	AMPc>GMPc	0.02-0.15	0.18	0.34	3.0-6
PDE3B	AMPc>GMPc	0.28	0.38	2.0	8.5
PDE4A	AMPc>GMPc	—	2.9-10	—	0.58
PDE4B	AMPc>GMPc	—	1.5-4.7	—	0.13
PDE4C	AMPc>GMPc	—	1.7	—	0.31
PDE4D	AMPc>GMPc	—	1.2-5.9	—	0.03-1.56
PDE5A	GMPc>AMPc	2.9-6.2	290	1.3	1.0
PDE6A/B	GMPc>AMPc	15	700	2300	—
PDE6C	GMPc>AMPc	17	610	1400	—
PDE7A	AMPc>GMPc	—	0.1-0.2	—	—
PDE7B	AMPc>GMPc	—	0.03-0.07	—	—
PDE8A	AMPc>GMPc	—	0.06	—	—
PDE8B	AMPc>GMPc	—	0.10	—	—
PDE9A	GMPc>AMPc	0.70-0.17	230	—	—
PDE10A	AMPc>GMPc	13-14	0.22-1.1	—	—
PDE11A	AMPc≈GMPc	0.95-2.1	2.0-3.2	—	—

Legenda: —, não existe informação disponível; V_{máx}, velocidade máxima; K_M, constante de Michaelis; ≈ idêntico.

Tabela 5 – Propriedades regulatórias das PDEs (Gupta *et al.*, 2005b)

Famílias de PDE (Subfamílias)	Moduladores
PDE1 (A, B, C)	Activação por Cálcio/Calmodulina.
PDE2 (A)	Activação por GMPc.
PDE3 (A, B)	Inibição por GMPc.
PDE4 (A, B, C, D)	Elevada afinidade para o AMPc; em condições fisiológicas hidrolisa selectivamente este nucleótido cíclico.
PDE5 (A)	Elevada afinidade para o GMPc; em condições fisiológicas hidrolisa selectivamente este nucleótido cíclico. Activação por GMPc.
PDE6 (A, B)	Elevada afinidade para o GMPc; em condições fisiológicas hidrolisa selectivamente este nucleótido cíclico. Activação pela transducina.
PDE7 (A, B)	Elevada afinidade para o AMPc; em condições fisiológicas hidrolisa selectivamente este nucleótido cíclico. Actividade não afectada pelo rolipram.
PDE8 (A, B)	Elevada afinidade para o AMPc; em condições fisiológicas hidrolisa selectivamente este nucleótido cíclico. Actividade não afectada pelo rolipram, nem pelo IBMX (3-isobutil-1-metilxantina).
PDE9 (A)	Elevada afinidade para o GMPc; em condições fisiológicas hidrolisa selectivamente este nucleótido cíclico. Actividade não afectada pelo IBMX.
PDE10 (A)	Inibição por AMPc.
PDE11 (A)	Idêntica especificidade para o AMPc e o GMPc.

A maioria das famílias é codificada por mais de um gene e, além disso, é bom não esquecer que alguns destes genes podem sofrer *splicing* alternativo em alguns tecidos. Deste processo resulta o aparecimento de RNAm diferentes e de proteínas com as suas propriedades de regulação alteradas ou em localizações diferentes.

No que respeita à nomenclatura das PDEs, as duas primeiras letras descrevem a espécie de origem. Seguidamente, a família é designada por um número árabe (PDE1 a PDE11), a subfamília por uma letra maiúscula (A a D) e a variante (*splice variant* ou *start site variant*) por um número árabe (1, 2, 3, ..., de acordo com a ordem pela qual foram identificadas). Por exemplo, a designação HsPDE1A1 refere-se à primeira variante identificada da subfamília A da família 1 da espécie humana (Hs significa *Homo sapiens*) (Dimitriadis *et al.*, 2008).

Algumas famílias de PDEs são compostas por duas, três ou quatro subfamílias, as quais apresentam, dentro da mesma família, uma homologia sequencial superior a 70% e idêntica organização dos domínios proteicos (estrutura terciária). Existem 21 subfamílias de PDEs, correspondentes aos 21 genes mencionados.

Cada família de PDE apresenta diferenças quanto à sua especificidade para o substrato, propriedades cinéticas, regulação alostérica e interacção com inibidores específicos. Assim,

algumas PDEs apenas hidrolisam AMP_C (PDE4, PDE7 e PDE8), outras apenas GMP_C (PDE5, PDE6 e PDE9), enquanto outras hidrolisam AMP_C e GMP_C (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 e PDE11). Portanto, a localização celular distinta e as diferentes características biofísicas das PDEs indicam que cada variante de PDE desempenha um papel distinto em processos fisiológicos específicos.

Por exemplo, a família PDE1 envolve 3 genes (PDE1A, PDE1B e PDE1C) que são activados pela ligação da calmodulina na presença de cálcio levando a um aumento da hidrólise de AMP_C e GMP_C. Mais especificamente, os enzimas PDE1A e PDE1B hidrolisam selectivamente GMP_C enquanto a variante PDE1C hidrolisa AMP_C e GMP_C com elevada afinidade (Dimitriadis *et al.*, 2008).

A família PDE2A hidrolisa AMP_C e GMP_C, no entanto, tem maior afinidade para o GMP_C do que para o AMP_C. As 3 variantes de PDE2 são codificadas apenas por um gene. PDE2A humana encontra-se expressa no cérebro, no córtex adrenal e, com menor expressão no coração, fígado, músculo esquelético, rins e pâncreas. Parece regular a produção de aldosterona nas células glomerulosas adrenais mediadas pela regulação dos efeitos do GMP_C nas plaquetas sanguíneas, cardiomiócitos e células endoteliais vasculares. Num estudo recente foi demonstrado que a inibição deste tipo de PDE por um inibidor de PDE chamado Bay-60-7550 parece melhorar a memória, por reforçar a plasticidade neuronal (Dimitriadis *et al.*, 2008).

A família da PDE3 permite que o GMP_C potencie o sinal de AMP_C. Esta família é composta por 2 genes: PDE3A e PDE3B. A PDE3A está envolvida na regulação da agregação plaquetária enquanto PDE3B regula a lipólise da insulina pelos adipócitos. Além disso, a PDE3B também regula a inibição de leptina nas células beta do pâncreas. As concentrações de RNAm de PDE3B é mais elevada nos adipócitos, hepatócitos, cérebro, no epitélio do ducto renal e espermátócitos em desenvolvimento (Reinhardt *et al.*, 1995). Alguns tecidos expressam PDE3A e PDE3B mas os níveis de PDE3A são geralmente superiores. Por outro lado, PDE3A e PDE3B são directamente inibidas pelo GMP_C, que compete com o AMP_C para o mesmo centro activo. Os enzimas da PDE3 são de grande interesse terapêutico no sistema cardiovascular. Existem alguns inibidores selectivos da família PDE3, incluindo milrinona, amrinona, cilostamida e cilostazol (Dimitriadis *et al.*, 2008).

A família PDE4 hidrolisa apenas AMP_C. Foram descritas 4 isoformas (A, B, C e D), cada uma codificada por um gene separado, tanto em roedores (Swinnen *et al.*, 1989) como em humanos. Cada isoforma é caracterizada por uma única região N-terminal que contém regiões de sequências de aminoácidos denominadas UCRs e que desempenham diversas funções de regulação. Isoformas funcionais PDE4 podem ser divididas em 3 categorias principais: longas, curtas e super-curtas (Houslay, 2001). Estas isoformas encontram-se expressas em quase todas as células excepto nas plaquetas sanguíneas (Maurice *et al.*, 2003). Algumas isoformas longas de PDE4 são activadas selectivamente por fosforilação dependente de PKA (Conti *et al.*, 2003; Houslay *et al.*, 2003). Merece especial atenção a forma como os inibidores selectivos de PDE4 demonstram actividade anti-inflamatória em modelos animais. De facto, há grande interesse em aplicar os inibidores selectivos da PDE4 para o tratamento de asma, doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) (Souness *et al.*, 2000), artrite reumatóide e cancro. Além disso, estes inibidores podem apresentar também actividade antidepressiva (O'Donnell, 1993; Zhang *et al.*, 2000).

A PDE5 hidrolisa especificamente GMP_C a 5' GMP. Esta família de PDE consiste num único gene PDE5.

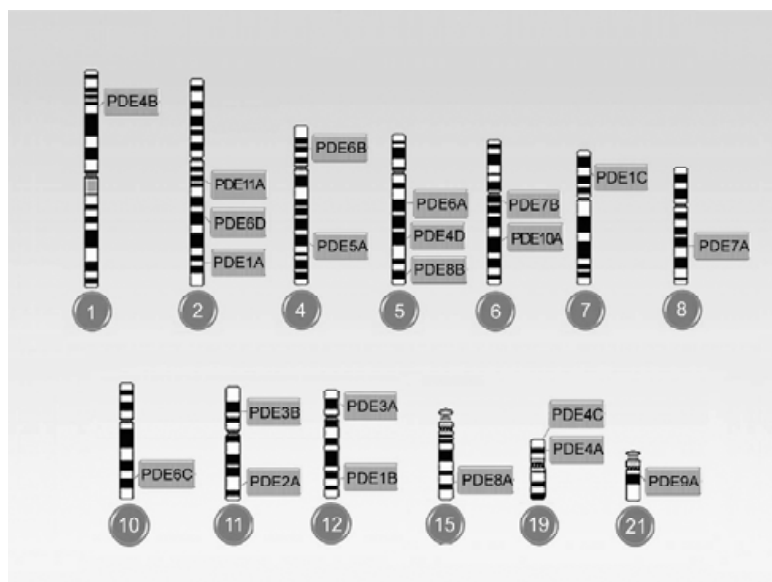


Figura 14 – Genes envolvidos na codificação das PDEs (Dimitriadis *et al.*, 2008)

Foi demonstrada a existência de 3 isoformas de PDE5 (PDE5A1, 2 e 3) geradas por splicing alternativo que diferem apenas nos terminais 5' do seu RNAm correspondente e no terminal N da proteína (Lin *et al.*, 2000; McAllisterLucas *et al.*, 1995). As PDE5A1 e PDE5A2 podem

encontrar-se ambas expressas em alguns tecidos, no entanto, PDE5A3 parece apenas expressar-se em células do músculo liso (Lin *et al.*, 2001). O sucesso dos inibidores selectivos da PDE5 no tratamento da DE aumentou o interesse na investigação dos efeitos da inibição da PDE5 em doenças vasculares, trombóticas ou pulmonares (Francis *et al.*, 2001).

A PDE6 é um enzima fulcral no processo de fototransdução em vertebrados pois encontra-se na retina e hidrolisa o GMP_C . A PDE6 é um enzima que provoca a diminuição dos níveis citoplasmáticos de GMP_C ao ser activada pela incidência da luz no receptor (e.g., rodopsina) (Burns *et al.*, 2001; Koutalos *et al.*, 1995; Nakatani *et al.*, 2002). Esta PDE caracteriza-se por ter duas subunidades catalíticas homologas ($P\alpha$, β) e por duas subunidades inibitórias idênticas ($P\gamma$). A actividade da PDE6 é diminui por acção de inibidores selectivos como o sildenafil, tadalafil (Daugan *et al.*, 2003) e o vardenafil (Saenz de Tejada *et al.*, 2001).

Existem também diferenças na selectividade para as restantes famílias de PDEs, sendo a selectividade para a PDE6 de particular interesse clínico pela possibilidade de ocasionar distúrbios visuais (distúrbios na percepção da cor), como acontece com o sildenafil e o vardenafil (Laties *et al.*, 2002; McCullough, 2003; Zhang *et al.*, 2005).

A família PDE7 inclui PDEs específicas para AMP_C . Foram identificados 2 genes desta família: PDE7A e PDE7B. Segundo (Bloom *et al.*, 1996; Glavas *et al.*, 2001; Miro *et al.*, 2001), a PDE7A tem 3 isoformas obtidas por splicing alternativo e que se encontra maioritariamente em:

- a) células T e cérebro (PDE7A1);
- b) células musculares (PDE7A2);
- c) células T activadas (PDE7A3).

A família da PDE7 desempenha uma papel importante na regulação da função das células T humanas, incluindo a produção de citocina, proliferação e expressão de marcadores de activação. Sendo assim, os inibidores selectivos de PDE7 podem ter um papel importante no tratamento de doenças mediadas por células T e em complicações das vias aéreas (Smith *et al.*, 2003). Embora não exista actualmente nenhum inibidor selectivo da PDE7 utilizado na terapêutica farmacológica, foi recentemente sugerida a ideia de utilizar esta família de PDEs como alvo da terapêutica anti-inflamatória. Esta sugestão baseia-se no facto do aumento da expressão de PDE7A1 estar associada ao aumento da produção de IL-2 e à proliferação de

linfócitos T humanos estimulados por anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 e, ainda, ao facto da introdução de oligonucleótidos *antisense* dirigidos contra a PDE7A nestas células (a fim de bloquear selectivamente a expressão de PDE7A) prevenir aquelas respostas imunitárias (Glavas *et al.*, 2001; Li *et al.*, 1999).

A família da PDE8 apresenta elevada afinidade para AMP_C insensível a IBMX (inibidor não específico de PDEs). As duas isoformas existentes são a PDE8A e PDE8B, que foram encontradas em humanos e ratinhos (Fisher *et al.*, 1998; Soderling *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2001). A PDE8A encontra-se em vários tecidos, tais como, testículos, baço, cólon, intestinos delgado, ovários, placenta e rins, enquanto a PDE8B, apenas foi encontrada na glândula tiroidea.

A PDE9 é específica para o GMP_C. A proteína codificada por este gene desempenha um importante na transdução de sinal regulando a concentração de GMP_C intracelular. Esta PDE encontra-se em vários tecidos, como por exemplo, no cérebro, coração, placenta, rim, baço, e cólon. A PDE9A foi também encontrada numa região cromossomal que se encontra ligada a duas doenças genéticas: surdez hereditária não-sindrómica (Bonne-Tamir *et al.*, 1996; Veske *et al.*, 1996) e na perturbação afectiva bipolar (Gurling, 1998; Straub *et al.*, 1994). Deste modo, parece haver indícios de que a regulação da expressão deste enzima pode estar ligada com o desenvolvimento destas doenças. O facto de ainda não existirem grandes estudos acerca de inibidores deste enzima, o estudo do papel da PDE9A nestas duas doenças é ainda muito precoce.

Apesar de poder ser inibida por outras moléculas (e.g., IBMX), a PDE10A tem maior especificidade para o GMP_C. Devido ao facto de se encontrar numa região com receptores de dopamina, esta PDE está ligada ao Parkinsonismo juvenil (Philipp *et al.*, 1994). A sua expressão é mais elevada no cérebro e testículos do que no coração, tiroide, rins e pulmões (Bender *et al.*, 2006).

A isoforma PDE11A1, pertencente à família das PDE11, tem a capacidade de hidrolisar AMP_C e GMP_C. É sensível ao IBMX, zaprinaste e piridamol, que também inibe outras famílias de PDE (e.g., PDE5 e PDE6). Esta PDE é encontrada em níveis elevados no músculo esquelético e na próstata humana, apesar de também ser possível encontrá-la nos rins, fígado, glândulas pituitária e salivar e testículos (Fawcett *et al.*, 2000).

O facto das PDEs se encontrarem em tecido tão distintos faz com que sejam um alvo de estudo muito atractivo para novos fármacos. Os inibidores selectivos das PDEs têm sido amplamente estudados como cardiotónicos, vasodilatadores, relaxantes do músculo liso, antidepressivos, antitrombóticos, antiasmáticos e como agentes para desenvolvimento da função cognitiva, tais como a aprendizagem e a memória (Iwasaki *et al.*, 1996; Kulkarni *et al.*, 1991; Marmor *et al.*, 1999; Natsugari *et al.*, 1995; Thompson *et al.*, 1979; Ukita *et al.*, 1999a; Ukita *et al.*, 1999b). Estão disponíveis no mercado alguns inibidores de PDEs, no entanto, estes inibidores apenas demonstram selectividade parcial para isoformas específicas de PDEs. Há ainda algumas famílias de PDEs que não possuem inibidores disponíveis como é o caso da PDE 8, 9 e 10.

A avaliação e acção dos inibidores de PDEs *in vivo* ou *in vitro* é limitada pela permeabilidade específica das células, pela incerteza quanto à concentração de inibidor presente no interior da célula e pela localização das PDEs no tipo de célula em estudo. Por vezes, o efeito dos inibidores de PDEs testados *in vivo* não são concordantes com os estudos *in vitro* (Haynes *et al.*, 1991; Ruppert *et al.*, 1982; Whalin *et al.*, 1991). Tal acontece devido à diferença de complexidade verificada nos dois modelos (daí a importância dos estudos *in vivo* para validar os resultados obtidos *in vitro*).

4.5. Isoformas de PDE no sistema reprodutor masculino

Os estudos que têm por base os mecanismos responsáveis pela contracção e relaxamento dos ductos genitais masculinos permitem clarificar todo o processo de transporte dos espermatozóides desde a espermatogénese até à ejaculação.

Como já referido anteriormente, o segundo mensageiro GMP_c é essencial para a contracção dos túbulos seminíferos (Middendorff *et al.*, 1997), dos testículos (Middendorff *et al.*, 2002) e dos ductos epididimais (Mewe *et al.*, 2006). Desempenha também uma papel importante no transporte e maturação dos espermatozóides nos epidídimos (Tamura *et al.*, 2004).

Estudos revelam que a expressão de PDEs nos testículos se restringe, predominantemente, a PDEs específicas para AMP_c, tais como, PDE1C, PDE4A, PDE4C,

PDE7B e PDE8A e existe também informação acerca da existência de PDEs nas células da linha germinativa (Bender *et al.*, 2006). Recentemente, a PDE5 foi identificada em miócitos peritubulares de ratinhos (Scipioni *et al.*, 2005) e a regulação dos processos de espermatogénese e da função erétil mediados pela PDE11 tem revelado muita importância, uma vez que a PDE11 é substrato do tadalafil (Francis, 2005). Também há indícios de que a PDE3 possa estar envolvida na regulação da contracção dos ductos epididimais (Mewe *et al.*, 2006).

4.5.1. Isoformas de PDE no espermatozóide humano

Desde 1971 que se conhece a existência de NOS (Lewis *et al.*, 1996) e de PDE (Gray *et al.*, 1971), havendo resultados que evidenciam a presença de várias PDEs no espermatozóide. Por exemplo, a PDE4 encontra-se distribuída no flagelo, no citosqueleto e, maioritariamente, na peça intermédia. A PDE1 está distribuída pelas três regiões do espermatozóide, sendo a cabeça do espermatozóide o local que mais expressa esta PDE (Fisch *et al.*, 1998). Estes dados foram sustentados por (Lefievre *et al.*, 2002) que identificou a presença de PDE1A em espermatozoides humanos. Além disso, também foi identificada neste estudo a PDE3A na região acrossomal da cabeça do espermatozóide, revelando a sua importância na reacção acrossómica.

Cheng *et al.*, 1982, conseguiram provar a existência de, pelo menos, cinco isoenzimas da PDE no esperma humano, enquanto Richter *et al.*, 1999, demonstrou a presença de RNA_m em espermatozoides, correspondente a vários subtipos de PDEs (e.g. PDE3B, PDE4A, PDE4B e PDE8). No entanto, ainda não é possível determinar se este RNA_m é produto de uma nova síntese ou se foi sintetizado numa fase anterior da espermatogénese.

4.6. Os inibidores da PDE5 no tratamento da DE

A DE representa um tabu para muitas sociedades e os avanços científicos para o tratamento desta patologia não foram tão desenvolvidos como noutras áreas da farmacologia. Contudo, o aparecimento do primeiro fármaco oral para o tratamento da DE (sildenafil), fez com que esta doença se tornasse uma prioridade para algumas

empresas farmacêuticas. Como já foi referido, o sildenafil, o tadalafil e o vardenafil são os principais inibidores da PDE5, muito usados no tratamento da DE.

Devido ao mecanismo de acção, farmacocinética e metabolismo, o sildenafil está contraindicado em pacientes que estejam a fazer tratamento cardiovascular com nitratos. No entanto, se o tratamento de doenças cardiovasculares foi feito com IECAs, bloqueadores alfa ou beta, bloqueadores dos canais de cálcio ou diuréticos, é seguro tomar sildenafil, pois, de acordo com Kloner *et al.*, 2001, o sildenafil não possui efeito sinérgico na pressão arterial quando administrado com qualquer um destes fármacos. Os estudos *in vitro* indicam que o sildenafil é um fraco inibidor do citocromo P450.

Como referido anteriormente, o vardenafil foi aprovado em 2003, tendo sido o segundo inibidor da PDE5 a ser introduzido no mercado. O vardenafil também é um fraco inibidor do citocromo P450 e é contraindicado a pacientes que façam tratamento com nitratos. Tal como no caso do vardenafil, foram descritos alguns efeitos secundários relacionados com alterações na visão (ver secção 2.6.1.1.).

O tadalafil é também um inibidor da PDE5, estando disponível no mercado desde 2002. A sua estrutura molecular difere significativamente da estrutura do sildenafil e vardenafil, que são semelhantes entre si. As concentrações de tadalafil necessárias para inibir a PDE5 têm um efeito inibitório menor na PDE6 quando comparada com os outros dois inibidores. De facto, há estudos que revelam que o tadalafil não provoca alterações na visão (Hellstrom *et al.*, 2003). Além da PDE5, o tadalafil também inibe a PDE11, estando as lombalgias e mialgias possivelmente relacionadas com a inibição desta PDE (Hellstrom *et al.*, 2003; Porst, 2002).

Alguns investigadores realizaram estudos sobre a expressão da PDE11 no homem e foi demonstrada a presença de PDE11A4 na próstata, glândula pituitária, coração e fígado (Loughney *et al.*, 2005).

Tal como acontece com os outros dois inibidores da PDE5, a administração de tadalafil é segura em pacientes com hipertensão cuja, terapêutica não contenha nitratos.

4.7. Efeito dos inibidores não-selectivos da PDE nos parâmetros do esperma

O efeito estimulante dos inibidores da PDE na motilidade dos espermatozóides parece estar associado, sendo necessário efectuar estudos *in vivo* e *in vitro* para determinar a influência dos inibidores na capacidade de progressão do espermatozóide (Fisch *et al.*, 1998; Sikka *et al.*, 1991). No entanto, poucos são os estudos que aplicam inibidores selectivos da PDE5, como por exemplo, o sildenafil, vardenafil e tadalafil.

Muitas moléculas foram alvo de estudos *in vivo* e *in vitro* no sentido de estimular as funções do espermatozóide. A teofilina foi o primeiro inibidor das PDEs a ser descrito na literatura, em 1962 (Butcher *et al.*, 1962). Uma década mais tarde, um novo derivado xantínico, o 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), revelou uma potência inibidora 100 vezes maior que a teofilina. Tanto a teofilina como o IBMX foram designados como inibidores não selectivos das PDEs, pois inibem de forma semelhante as PDEs das famílias 1 a 5.

Assim, as metilxantinas pertencem à primeira geração de inibidores das PDEs e representam um grupo de fármacos derivados das xantinas, incluindo, teofilina, cafeína, pentoxifilina, entre outros. O seu efeito benéfico na motilidade do espermatozóide é conhecido desde 1970 (De Turner *et al.*, 1978; Haesungcharern *et al.*, 1973; Schill, 1975; Schill *et al.*, 1979). (Jaiswal *et al.*, 1996) demonstraram que a teofilina aumenta a motilidade dos espermatozóides. O mesmo acontece com a cafeína (Levin *et al.*, 1981; Rees *et al.*, 1990) que, no entanto, contradiz este facto, uma vez que promove, simultaneamente, a reacção acrossómica espontânea (Tesarik *et al.*, 1992a). A pentoxifilina (PTX) é o inibidor de PDEs menos selectivo existente (Fuse *et al.*, 1993; Marrama *et al.*, 1985; Moohan *et al.*, 1995; Pang *et al.*, 1993; Shen *et al.*, 1991; Tesarik *et al.*, 1992b; Tournaye *et al.*, 1994b; Wang *et al.*, 1983), no entanto, tem um efeito muito positivo no processo de fertilização *in vitro* (Tasdemir *et al.*, 1993; Yovich *et al.*, 1990; Yovich *et al.*, 1988; Yunes *et al.*, 2005). A PTX não só aumenta a motilidade do flagelo por aumento do AMP_c intracelular (Garbers *et al.*, 1980; Stefanovich, 1973; Tash *et al.*, 1983), como também por diminuição intracelular do anião superóxido e de espécies reactivas de oxigénio presentes no espermatozóide (Lopes *et al.*, 1998; Twigg *et al.*, 1998). O aumento da capacidade de fertilização *in vitro* provocada pela PTX não se deve ao aumento do número de espermatozóides com motilidade (Kinutani, 1999). De facto,

a PTX parece aumentar a velocidade curvilínea e a percentagem de espermatozóides hiperactivos (Kay *et al.*, 1993; Kinutani, 1999; Lewis *et al.*, 1993; Moohan *et al.*, 1993; Pang *et al.*, 1993; Paul *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1991; Tesarik *et al.*, 1992b; Tournaye *et al.*, 1994a).

4.8. Inibidores selectivos da PDE5 e os parâmetros do esperma: estudos *in vivo*

Purvis *et al.*, 2002, avaliou os efeitos do sildenafil na motilidade e morfologia dos espermatozóides. Para isso, comparou a dosagem de 100 mg de sildenafil com um placebo. Após avaliar todos os resultados, concluiu que, o sildenafil não mostrou provocar alterações na motilidade dos espermatozóides. Ao comparar o sildenafil com o placebo, não foi observado qualquer alteração na percentagem de espermatozóides imóveis, nem na percentagem de espermatozóides em movimento. Os valores médios do número de espermatozóides, da sua morfologia, viabilidade, volume e viscosidade também não demonstraram grande diferença entre si.

Este estudo veio confirmar estudos anteriores (Aversa *et al.*, 2000) que também não obtiveram variações estatisticamente relevantes na variação dos valores médios do número de espermatozóides, sua motilidade e morfologia. No entanto, o período refractário foi significativamente menor em pacientes a tomar sildenafil. Deste modo, os autores propuseram o uso de sildenafil em casos de reprodução assistida, pois pode ocorrer DE devido ao stress e à pressão psicológica de obter uma ejaculação, caso seja necessário recolher mais do que uma amostra de esperma durante o dia em que se recolhe o ócito para fecundação (Tur-Kaspa *et al.*, 1999).

Contrastando com estes estudos, o efeito do sildenafil na cinemática do espermatozóide também foi provado. Du Plessis *et al.*, 2004 efectuou estudos *in vivo* com citrato de sildenafil (50 mg). Ao comparar com um placebo, o sildenafil não provocou alterações na percentagem de espermatozóides com motilidade progressiva, no entanto, demonstrou alterações na velocidade dos espermatozóides em linha recta. Além disso, ao submeter os espermatozóides ao teste de interacção espermatozóide-ócito (sperm

oocyte binding assay - SOBA), este demonstrou resultados favoráveis. Deste modo, os autores concluíram que o sildenafil favorece o movimento dos espermatozóides e da sua ligação ao ócito.

O sildenafil (50 mg) foi ainda posto à prova no estudo de Jannini *et al.*, 2004, onde também não foi demonstrado efeito no número de espermatozóides com mobilidade, nem na concentração do esperma ou no número de espermatozóides presentes no ejaculado. Contudo, houve um aumento da motilidade dos espermatozóides em linha recta, após administração de sildenafil. Além disso, demonstrou ainda ter um efeito positivo no número de espermatozóides e na sua motilidade quando administrado após primeira ejaculação. Então, foi aconselhado pelos autores a toma de sildenafil antes da colheita de esperma para reprodução assistida, com o objectivo de reduzir o stress provocado pelo facto do paciente se encontrar numa clínica de fertilidade. Outro estudo revelou ainda que a satisfação tem um efeito sexual positivo muito importante. Por exemplo, assistir a vídeos com conteúdo sexual durante a masturbação, resulta na recolha de espermatozóides com maior potencial de fertilização (Yamamoto *et al.*, 2000).

Sofikitis *et al.*, 1993b, demonstrou melhores resultados na motilidade dos espermatozóides recolhidos durante o acto sexual do que durante a masturbação. Deste modo, os autores defendem que quanto maior for a estimulação sexual, melhores serão as funções secretoras da próstata e maior quantidade de esperma se encontrará nos canais deferentes, resultando no aumento de motilidade dos espermatozóides.

Um estudo conduzido por Kanakas *et al.*, 2001, teve como objectivo avaliar os efeitos do sildenafil na qualidade do esperma e na função das glândulas acessórias. Fez-se uma avaliação da α -glucosidase (marcador da função dos epidídimos), fructose (marcador da função das vesículas seminais) e ácido cítrico (marcador da função secretora da próstata). Os resultados apresentaram um aumento do número de espermatozóides, da percentagem de espermatozóides com mobilidade e dos níveis de citrato no plasma após administração de sildenafil. De acordo com estes resultados, o sildenafil parece aumentar a função secretora da próstata, sendo o ácido cítrico importante para manter o seu equilíbrio osmótico (Ponchietti *et al.*, 1984). O zinco é um potente antibacteriano que é excretado pela próstata, tal como a espermina, substância presente no fluido

seminal, que também se encontra relacionada com a quantidade e motilidade dos espermatozóides. O esperma também possui colesterol que é sintetizado pela próstata e ajuda a estabilizar a membrana contra alterações de temperatura e de ambiente (Dimitriadis *et al.*, 2008).

Ali *et al.*, 2007, administrou 100 mg de citrato de sildenafil a diabéticos, tendo observado aumento da motilidade e volume de esperma mas, por outro lado, a morfologia dos espermatozóides manteve-se inalterada. O sildenafil provocou redução na acumulação intersticial de colagénio e na calcificação dos músculos lisos. Neste estudo o sildenafil demonstrou aumentar a motilidade do espermatozóide, no entanto, o uso prolongado deste inibidor da PDE5 pode levar à diminuição do número de espermatozóides no ejaculado.

Foi desenvolvido um estudo comparativo entre sildenafil (50 mg) e tadalafil (20 mg) em jovens inférteis (Pomara *et al.*, 2007). Este estudo demonstrou um aumento da motilidade progressiva dos espermatozóides após administração de sildenafil, que se deve à acção directa deste fármaco nas mitocôndrias e nos canais de cálcio presentes nos espermatozóides. Contrastando com este resultado, após administração de tadalafil, a motilidade dos espermatozóides diminuiu. Estes dados são inconsistentes com o estudo conduzido por Hellstrom *et al.*, 2003, que investigou os efeitos do tadalafil e as concentrações das gonadotrofinas em homens com DE. Este estudo demonstrou que não houve alterações na morfologia ou motilidade dos espermatozóides após tratamento com tadalafil (10 e 20 mg), nem na concentração das gonadotrofinas. Apesar deste estudo indicar que o tratamento diário com tadalafil durante 6 meses não afecta adversamente a espermatogénese, outros investigadores acham que ainda não existe informação suficiente que dê essa segurança relativamente a este fármaco (Guzick *et al.*, 2001; Pomara *et al.*, 2007).

Os estudos realizados por Bauer *et al.*, 2002, debruçaram-se sobre a acção do vardenafil (20 mg) nos índices da função testicular. O seu efeito na motilidade dos espermatozóides, concentração, viabilidade e morfologia foi significativamente positivo. Outro estudo, avaliando a acção do vardenafil, foi conduzido por Grammeniatis *et al.*, 2007, e demonstrou que este inibidor da PDE5 aumenta a função secretora da próstata (contrastando com os resultados obtidos para a secreção das vesículas seminais e dos

epidídimos). Além disso, após 45 dias de tratamento com vardenafil, foram recolhidos resultados acerca do número de espermatozóides, quantidade de espermatozóides com mobilidade, percentagem de espermatozóides morfolologicamente normais, concentração de ácido cítrico no esperma e concentração de fosfatase ácida no esperma. Todos estes dados apresentaram um aumento estatisticamente significativo, possibilitando aos autores concluir que o vardenafil estimula a função secretora da próstata, aumentando a quantidade e a motilidade dos espermatozóides. O aumento significativo da percentagem de espermatozóides morfolologicamente normais pode ser atribuído à função secretora da próstata, uma vez que esta regula o equilíbrio osmótico do plasma seminal, diminuindo o número de espermatozóides que são submetidos a choque osmótico e a alterações morfológicas.

4.9. Inibidores selectivos da PDE5 e os parâmetros do esperma: estudos *in vitro*

Após a introdução do sildenafil no mercado, muitos foram os estudos *in vitro* que se debruçaram sobre este inibidor da PDE5 na tentativa de avaliar o seu efeito nos vários parâmetros do esperma. O estudo orientado por Burger *et al.*, 2000, teve como objectivo avaliar o efeito do sildenafil na motilidade, viabilidade, integridade da membrana e capacidade de progressão do espermatozóide humano. Para isso, as amostras foram divididas e incubadas durante 0h, 1h e 3h, na presença ou ausência de sildenafil (125 ng/ml, 250 ng/ml e 750 ng/ml), de PTX (controlo positivo) e de um reagente de controlo (*Ham's medium*). O efeito do sildenafil sobre a motilidade, viabilidade e capacidade de progressão dos espermatozóides não demonstrou ser estatisticamente significativo. No entanto, ao nível da membrana, o tratamento com sildenafil demonstrou uma diminuição na sua integridade, devendo este resultado ser considerado quando se planeia fazer tratamento com este fármaco em casais cujo marido possui algum factor de infertilidade.

Andrade *et al.*, 2000, estudaram o efeito directo do sildenafil e fentolamina na motilidade dos espermatozóides. Foi demonstrada uma inibição da motilidade espermática dependente da dose nas amostras tratadas com fentolamina, não tendo

sido registado qualquer efeito adverso nas amostradas tratadas com sildenafil (200 µg/ml). No entanto, doses elevadas de sildenafil (2000 µg/ml) também demonstraram uma redução de 50% na motilidade dos espermatozóides.

Um outro estudo (Lefievre *et al.*, 2000) teve como objectivo investigar a presença de PDE5 nos espermatozóides humanos, bem como o efeito do sildenafil na fertilidade. Foi demonstrado que este inibidor da PDE5 estimula a motilidade dos espermatozóides aumentando o AMP_c intracelular. Tal resultado sugere que o sildenafil tem também acção inibitória sobre outra PDE, diferente da PDE5. Para inibir a actividade do enzima, a concentração de sildenafil e dipiridamol foi aumentada (inibidores selectivos de PDE5 dependente de GMP_c). O sildenafil demonstrou ter um potencial de inibição 4 vezes superior e a concentração de AMP_c aumentou. As várias concentrações de sildenafil (30 µmol/L, 100 µmol/L e 200 µmol/L) aumentaram a capacidade de fertilização dos espermatozóides. Apesar da reacção acrossómica ser despoletada por lisofosfatidilcolina, tal não aconteceu com sildenafil nem com outros inibidores de PDEs isolados. Pensa-se então que o sildenafil poderá ter acção em diferentes PDEs, além da PDE5 e que, em concentrações elevadas, este deixa de ser específico para o tipo 5, inibindo também a PDE1 e PDE4, que têm elevada afinidade para o AMP_c, explicando assim o aumento intracelular de AMP_c com sildenafil.

Outro estudo (Cuadra *et al.*, 2000) demonstrou também o efeito do sildenafil na motilidade dos espermatozóides e na reacção acrossómica, expondo os espermatozóides a diferentes concentrações de sildenafil (0 nmol/L, 0.4 nmol/L, 4.0 nmol/L e 40 nmol/L). Foi observado um aumento da motilidade na presença de 0.4 nmol/L de sildenafil que, no entanto, diminui 48h após a exposição ao sildenafil. As concentrações mais elevadas de sildenafil (40 nmol/L) provocaram uma diminuição da motilidade. O sildenafil afectou a reacção acrossómica em 50% neste estudo (é sabido que o GMP_c abre os canais de cálcio, favorecendo a reacção acrossómica, do mesmo modo que o GMP_c também regula a entrada de cálcio para o flagelo, afectando a motilidade dos espermatozóides). É então este mecanismo duplo que provoca a estimulação do espermatozóide, aumentando a sua motilidade quando a PDE5 é inibida moderadamente (inibição total da PDE5 têm o efeito contrário).

Houve ainda outro estudo (Glenn *et al.*, 2007) que expôs os espermatozóides a concentrações de sildenafil (0,67 $\mu\text{mol/L}$) semelhantes às encontradas no plasma 1h após administração de sildenafil 100 mg. Neste estudo, o número e a velocidade dos espermatozóides aumentaram consideravelmente. Contudo, o sildenafil também parece aumentar a reacção acrossómica, revelando afectar a fertilidade masculina. Os cientistas sugerem que tal acontece devido ao aumento de GMP_c resultante da inibição da PDE5, que afecta o transporte de cálcio para o interior do espermatozóide, favorecendo a reacção acrossómica.

Os efeitos do tadalafil na motilidade dos espermatozóides também foram testados *in vitro*. Mostafa, 2007, usaram diferentes concentrações de tadalafil (4.0, 1.0, 0.5 mg/ml) para obter conclusões acerca da acção do tadalafil na motilidade dos espermatozóides. A concentração mais elevada de tadalafil (4.0 mg/ml) demonstrou uma diminuição dessa motilidade, no entanto, as concentrações de 1.0 e 0,5 mg/ml mostraram aumentar a motilidade dos espermatozóides. Nos mamíferos, as vias AMP_c/PKA e Ca^{2+} parecem influenciar a regulação da motilidade dos espermatozóides (Ho *et al.*, 2002). Deste modo, os efeitos *in vitro* do uso de tadalafil como regulador da motilidade dos espermatozóides (dependente da concentração do inibidor da PDE5) podem ser explicados com recurso a uma ou mais vias.

Por outro lado, o efeito do tadalafil na motilidade dos espermatozóides, pode ainda ser explicado devido ao seu efeito inibidor na PDE11, uma vez que esta se encontra bastante expressa nos testículos, próstata e células da linha germinativa. Wayman *et al.*, 2005, tentaram perceber o papel da PDE11 na fertilidade. Para isso, efectuaram um *knockout* do gene que codifica para a PDE11, tendo observado uma diminuição na concentração do esperma, na motilidade e na percentagem de espermatozóides vivos. Deste modo, a PDE11 também parece ser fundamental tanto na espermatogénese como na fertilização.

Fisch *et al.*, 1998, mostraram que os inibidores da PDE4 também aumentam a motilidade dos espermatozóides, sem afectar a reacção acrossómica (que é estimulada pelos inibidores da PDE1).

5. Conclusão

Para a realização desta dissertação, compilou-se informação disponível sobre o efeito dos inibidores da fosfodiesterase do tipo 5 na fertilidade masculina. Deste modo, foi possível mostrar todos os mecanismos que levam à erecção e ao desenvolvimento normal dos espermatozóides, tendo sido expostas algumas das causas que levam ao desenvolvimento da DE.

Foram apresentados alguns dos tratamentos da DE, sendo os inibidores da PDE5 os mais mediáticos e importantes nos dias de hoje. A ligação destes fármacos à fertilidade masculina é evidenciada nos estudos apresentados, no entanto, a complexidade dos seus mecanismos de acção levam à obtenção de resultados ambíguos.

Os estudos realizados *in vivo* e *in vitro* demonstram a existência de três abordagens diferentes. Alguns investigadores defendem que os inibidores da PDE5 não provocam qualquer alteração nos parâmetros do espermatozóide, enquanto outros afirmam que estes fármacos são prejudiciais para a função reprodutora masculina. No entanto, apesar de muita discrepância entre os resultados, muitos são os investigadores que demonstraram os efeitos positivos dos inibidores da PDE5 na fertilidade masculina.

Ao analisar os resultados de todos estes estudos apresentados, é evidente que os inibidores da PDE5 têm um efeito na motilidade dos espermatozóides. Verificou-se ainda que, a administração destes fármacos em doses baixas, provoca o aumento da motilidade, apresentando efeitos adversos quando administrados em dose superior. Além disso, a utilização destes fármacos foi também associada a um efeito estimulante na capacidade de progressão do espermatozóide, no início da reacção acrossómica e na ligação oócito-espermatozóide. No entanto, as alterações provocadas pelos inibidores da PDE5 na fertilidade masculina continuam ainda por clarificar, sendo a investigação nesta área de grande importância para esclarecer os seus possíveis efeitos.

É importante não esquecer que a utilização destes fármacos não é exclusiva para o tratamento da DE, uma vez que as fosfodiesterases se encontram nos mais distintos tecidos do organismo. Um dos exemplos mais conhecido é o tratamento de DPOC com recurso a um dos inibidores da PDE5 (sildenafil). Existem ainda estudos que procuram

avaliar a acção dos inibidores da PDE5 sobre o endométrio, havendo também a possibilidade destes fármacos apresentarem melhorias nos parâmetros da fertilidade feminina.

Deste modo, antevê-se que, num futuro próximo, os inibidores da PDE5 possam vir a ter grande influência no tratamento da infertilidade, visto que a sua introdução no mercado é ainda recente e que só agora se estão a recolher os primeiros dados sobre a acção destes fármacos.

6. Anexos

Tabela 6 – Resumo dos parâmetros avaliados por cada estudo *in vivo*

Estudo	Fármaco	Parâmetros										
		Espermatozóides móveis	Espermatozóides imóveis	Motilidade progressiva	Número de espermatozóides	Morfologia	Volume	Velocidade do espermatozóide	Reacção acrossómica	Efeito psicológico	Secreções	Tratamento longo
Purvis et al. (2002)	Sildenafil 100 mg	II	II	II	II	II	II					
Aversa et al. (2000)	Sildenafil 100 mg	II	II	II	II	II	II			+		
du Plessis et al. (2004)	Sildenafil 50 mg			II		II		+				
Jannini et al. (2004)	Sildenafil 50 mg			+	+					+		
Yamamoto et al. (2000)	Sildenafil 50 mg			II	+					+		
Sofikitis et al. (1993)	Estimulação	+		+								
Kanakas et al. (2001)	Sildenafil	+			+						+	
Ali et al. (2007)	Sildenafil 100 mg	+				II	+					I
Pomara et al. (2007)	Sildenafil 50 mg			+								
	Tadalafil 20 mg	I										
Hellstrom et al. (2003)	Tadalafil 10 mg	II				II						
	Tadalafil 20 mg	II				II						
Bauer et al. (2002)	Vardenafil 20 mg	II	II	II	II	II						
Grammeniatitis et al. (2007)	Vardenafil 10 mg	+		+	+	+					+	

Legenda: (=) parâmetro avaliado inalterado; (+) parâmetro alterado positivamente; (-) parâmetro alterado negativamente.

Tabela 6 – Resumo dos parâmetros avaliados por cada estudo *in vitro*

Estudo	Fármaco	Parâmetros						
		Espermatozóides móveis	Espermatozóides imóveis	Motilidade progressiva	Número de espermatozóides	Velocidade do espermatozóide	Reacção acrossómica	Integridade da membrana
Burger et al. (2000)	Sildenafil	II	II	II			II	I
Andrade et al. (2000)	Sildenafil 200 µg/mL	II	II	II				
	Sildenafil 2000 µg/mL	I	I	I				
Lefievre et al. (2000)	Sildenafil	+	+	+			+	
Cuadra et al. (2000)	Sildenafil 0,4 nmol/L	+	+	+			+	
	Sildenafil 40 nmol/L	I	I	I				
Glenn et al. (2007)	Sildenafil 0,67 µmol/L				+	+		
Mostafa et al. (2007)	Tadalafil 0,5 mg/mL	+	+	+				
	Tadalafil 1,0 mg/mL	+	+	+				
	Tadalafil 4,0 mg/mL	I	I	I				

Legenda: (=) parâmetro avaliado inalterado; (+) parâmetro alterado positivamente; (-) parâmetro alterado negativamente.

Bibliografia

Aizawa K, Hanaoka T, Kasai H, Kogashi K, Kumazaki S, Koyama J, *et al.* (2006). Long-term vardenafil therapy improves hemodynamics in patients with pulmonary hypertension. *Hypertens Res* **29**(2): 123-128.

Ali ST, Rakkah NI (2007). Neurophysiological role of sildenafil citrate (Viagra) on seminal parameters in diabetic males with and without neuropathy. *Pak J Pharm Sci* **20**(1): 36-42.

Andersson KE (2003). Erectile physiological and pathophysiological pathways involved in erectile dysfunction. *J Urol* **170**(2 Pt 2): S6-13; discussion S13-14.

Andersson KE (2001). Pharmacology of penile erection. *Pharmacol Rev* **53**(3): 417-450.

Andrade JR, Traboulsi A, Hussain A, Dubin NH (2000). In vitro effects of sildenafil and phentolamine, drugs used for erectile dysfunction, on human sperm motility. *Am J Obstet Gynecol* **182**(5): 1093-1095.

Auerbach SM, Gittelman M, Mazzu A, Cihon F, Sundaresan P, White WB (2004). Simultaneous administration of vardenafil and tamsulosin does not induce clinically significant hypotension in patients with benign prostatic hyperplasia. *Urology* **64**(5): 998-1003; discussion 1003-1004.

Aversa A, Mazzilli F, Rossi T, Delfino M, Isidori AM, Fabbri A (2000). Effects of sildenafil (Viagra) administration on seminal parameters and post-ejaculatory refractory time in normal males. *Hum Reprod* **15**(1): 131-134.

Ayta IA, McKinlay JB, Krane RJ (1999). The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. *BJU Int* **84**(1): 50-56.

Bauer R, Rohde G (2002). *A single dose of Vardenafil had no acute effect on sperm motility in healthy males. 27th annual meeting of the American Society of Andrology.* edn: Seattle, Washington, USA.

Beavo J, Houslay M, Francis S (2007). *Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Superfamily, in Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases in Health and Disease (Beavo J, Francis S and Houslay M eds) pp 55-77, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.* edn.

Bender AT, Beavo JA (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* **58**(3): 488-520.

Benet AE, Melman A (1995). The epidemiology of erectile dysfunction. *Urol Clin North Am* **22**(4): 699-709.

Bloom TJ, Beavo JA (1996). Identification and tissue-specific expression of PDE7 phosphodiesterase splice variants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(24): 14188-14192.

Blount MA, Beasley A, Zoraghi R, Sekhar KR, Bessay EP, Francis SH, *et al.* (2004). Binding of tritiated sildenafil, tadalafil, or vardenafil to the phosphodiesterase-5 catalytic site displays potency, specificity, heterogeneity, and cGMP stimulation. *Mol Pharmacol* **66**(1): 144-152.

Boin F, Wigley FM (2005). Understanding, assessing and treating Raynaud's phenomenon. *Curr Opin Rheumatol* **17**(6): 752-760.

Bonne-Tamir B, DeStefano AL, Briggs CE, Adair R, Franklyn B, Weiss S, *et al.* (1996). Linkage of congenital recessive deafness (gene DFNB10) to chromosome 21q22.3. *Am J Hum Genet* **58**(6): 1254-1259.

Bremer YA, Salloum F, Ockaili R, Chou E, Moskowitz WB, Kukreja RC (2005). Sildenafil citrate (viagra) induces cardioprotective effects after ischemia/reperfusion injury in infant rabbits. *Pediatr Res* **57**(1): 22-27.

Brugh VM, 3rd, Matschke HM, Lipshultz LI (2003). Male factor infertility. *Endocrinol Metab Clin North Am* **32**(3): 689-707.

Burger M, Sikka SC, Bivalacqua TJ, Lamb DJ, Hellstrom WJ (2000). The effect of sildenafil on human sperm motion and function from normal and infertile men. *Int J Impot Res* **12**(4): 229-234.

Burnett AL (2002). Nitric oxide regulation of penile erection: biology and therapeutic implications. *J Androl* **23**(5): S20-26.

Burns ME, Baylor DA (2001). Activation, deactivation, and adaptation in vertebrate photoreceptor cells. *Annu Rev Neurosci* **24**: 779-805.

Butcher RW, Sutherland EW (1962). Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. *J Biol Chem* **237**: 1244-1250.

Campbell H (2005). Clinical monograph for drug formulary review: erectile dysfunction agents. *J Manag Care Pharm* **11**(2): 151-171.

Carmona M, Gonçalves J, Mendonça J, Pinheiro R, Sampaio C, Teixeira A, *et al.* (2010). *Prontuário Terapêutico on-line, INFARMED - Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento / Ministério da Saúde, Lisboa, 9ª Edição edn. Lisboa.*

Carson C (2006). PDE5 inhibitors: are there differences? *Can J Urol* **13 Suppl1**: 34-39.

Cellek S, Moncada S (1997). Nitric oxide control of peripheral sympathetic responses in the human corpus cavernosum: a comparison with other species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(15): 8226-8231.

Cheng CY, Boettcher B (1982). Partial characterization of human spermatozoal phosphodiesterase and adenylate cyclase and the effect of steroids on their activities. *Int J Androl* **5**(3): 253-266.

Cirino G, Fusco F, Imbimbo C, Mirone V (2006). Pharmacology of erectile dysfunction in man. *Pharmacology & Therapeutics* **111**(2): 400-423.

ClinicalTrials.gov (2009). Udenafil - clinical trials phase III.

Conti M, Beavo J (2007). Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem* **76**: 481-511.

Conti M, Richter W, Mehats C, Livera G, Park JY, Jin C (2003). Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *Journal of Biological Chemistry* **278**(8): 5493-5496.

Cookson MS, Nadig PW (1993). Long-term results with vacuum constriction device. *J Urol* **149**(2): 290-294.

Cooper TG, Aitken, Auger, Baker, Barratt, Behre, *et al.* (2005). WHO laboratory manual of the Examination and processing of human semen. *FIFTH EDITION*.

Corbin JD, Beasley A, Blount MA, Francis SH (2005). High lung PDE5: a strong basis for treating pulmonary hypertension with PDE5 inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* **334**(3): 930-938.

Cuadra DL, Chan PJ, Patton WC, Stewart SC, King A (2000). Type 5 phosphodiesterase regulation of human sperm motility. *Am J Obstet Gynecol* **182**(5): 1013-1015.

Daugan A, Grondin P, Ruault C, Le Monnier de Gouville AC, Coste H, Linget JM, *et al.* (2003). The discovery of tadalafil: a novel and highly selective PDE5 inhibitor. 2: 2,3,6,7,12,12a-hexahydropyrazino[1',2':1,6]pyrido[3,4-b]indole-1,4-dione analogues. *J Med Chem* **46**(21): 4533-4542.

De Turner E, Aparicio NJ, Turner D, Schwarzstein L (1978). Effect of two phosphodiesterase inhibitors, cyclic adenosine 3':5'-monophosphate, and a beta-blocking agent on human sperm motility. *Fertil Steril* **29**(3): 328-331.

Denninger JW, Marletta MA (1999). Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* **1411**(2-3): 334-350.

Derby CA, Mohr BA, Goldstein I, Feldman HA, Johannes CB, McKinlay JB (2000). Modifiable risk factors and erectile dysfunction: can lifestyle changes modify risk? *Urology* **56**(2): 302-306.

Deyoung L, Chung E, Kovac JR, Romano W, Brock GB (2011). Daily Use of Sildenafil Improves Endothelial Function in Type 2 Diabetic Men. *J Androl*.

Dimitriadis F, Giannakis D, Pardalidis N, Zikopoulos K, Paraskevaidis E, Giotitsas N, *et al.* (2008). Effects of phosphodiesterase 5 inhibitors on sperm parameters and fertilizing capacity. *Asian Journal of Andrology* **10**(1): 115-133.

Dong-A Pharmaceutical Co. L (2005). Zydna (Udenafil), a New Erectile Dysfunction (ED) Drug, Receives Marketing Approval in Korea. In: *Press Release*.

Dong-A PharmTech Co. L (2007). Dong-A PharmTech Co., Ltd. Announces Positive Results for Udenafil, Its New Long Acting Drug For Erectile Dysfunction. In: *Press Release*.

Donnelly ET, Lewis SE, Thompson W, Chakravarthy U (1997). Sperm nitric oxide and motility: the effects of nitric oxide synthase stimulation and inhibition. *Mol Hum Reprod* **3**(9): 755-762.

du Plessis SS, de Jongh PS, Franken DR (2004). Effect of acute in vivo sildenafil citrate and in vitro 8-bromo-cGMP treatments on semen parameters and sperm function. *Fertil Steril* **81**(4): 1026-1033.

Eardley I, Mirone V, Montorsi F, Ralph D, Kell P, Warner MR, *et al.* (2005). An open-label, multicentre, randomized, crossover study comparing sildenafil citrate and tadalafil for treating erectile dysfunction in men naive to phosphodiesterase 5 inhibitor therapy. *BJU Int* **96**(9): 1323-1332.

Episex-pt (2006). Sociedade Portuguesa de Andrologia - SPA, com apoio da Pfizer.

ESSM.org (2010). Male Sexual Dysfunction - Erectile Dysfunction
(<http://www.essm.org/society/medpubinf/erectiledysfunction.html>).

Fawcett L, Baxendale R, Stacey P, McGrouther C, Harrow I, Soderling S, *et al.* (2000). Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3702-3707.

Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, Krane RJ, McKinlay JB (1994). Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol* **151**(1): 54-61.

Fisch JD, Behr B, Conti M (1998). Enhancement of motility and acrosome reaction in human spermatozoa: differential activation by type-specific phosphodiesterase inhibitors. *Hum Reprod* **13**(5): 1248-1254.

Fisher DA, Smith JF, Pillar JS, St Denis SH, Cheng JB (1998). Isolation and characterization of PDE8A, a novel human cAMP-specific phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* **246**(3): 570-577.

Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H (1998). Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* **12**(10): 773-790.

Fox SI (2004). *Human Physiology, Eighth Edition*. Eighth edn. The McGraw-Hill Companies: New York.

Francis SH (2005). Phosphodiesterase 11 (PDE11): is it a player in human testicular function? *Int J Impot Res* **17**(5): 467-468.

Francis SH, Turko IV, Corbin JD (2001). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Relating structure and function. *Prog Nucleic Acid Re* **65**: 1-52.

Fuse H, Sakamoto M, Ohta S, Katayama T (1993). Effect of pentoxifylline on sperm motion. *Arch Androl* **31**(1): 9-15.

Garbers DL, Kopf GS (1980). The regulation of spermatozoa by calcium cyclic nucleotides. *Adv Cyclic Nucleotide Res* **13**: 251-306.

Glavas NA, Ostenson C, Schaefer JB, Vasta V, Beavo JA (2001). T cell activation up-regulates cyclic nucleotide phosphodiesterases 8A1 and 7A3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(11): 6319-6324.

Glenn DR, McVicar CM, McClure N, Lewis SE (2007). Sildenafil citrate improves sperm motility but causes a premature acrosome reaction in vitro. *Fertil Steril* **87**(5): 1064-1070.

Grammeniatitis E, Kanakas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Miyagawa I, Sofikitis N (2007). Effects of vardenafil in sperm parameters and semen biochemistry. 32nd annual meeting of American Society of Andrology, 21-25 April, Tampa, USA. *J Androl (Suppl)*. 2007; 28: 60.

Gray J, Hardman J, Hammer J, Hoos R, Sutherland E (1971). Adenyl cyclase, phosphodiesterase and cyclic AMP of human sperm and seminal plasma. *Fed Proc*; 30: 1267-9.

Green R, Hicks RW (2011). Orally disintegrating vardenafil tablets for the treatment of erectile dysfunction: efficacy, safety, and patient acceptability. *Patient Prefer Adherence* **5**: 181-185.

Guay AT, Perez JB, Velasquez E, Newton RA, Jacobson JP (2000). Clinical experience with intraurethral alprostadil (MUSE) in the treatment of men with erectile dysfunction. A retrospective study. Medicated urethral system for erection. *Eur Urol* **38**(6): 671-676.

Gupta M, Kovar A, Meibohm B (2005a). The clinical pharmacokinetics of phosphodiesterase-5 inhibitors for erectile dysfunction. *J Clin Pharmacol* **45**(9): 987-1003.

Gupta R, Kumar G, Kumar RS (2005b). An update on cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) inhibitors: phosphodiesterases and drug selectivity. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **27**(2): 101-118.

Gurling H (1998). Chromosome 21 workshop. *Psychiatr Genet* **8**(2): 109-113.

Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, *et al.* (2001). Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* **345**(19): 1388-1393.

Hackett G, Dean J, Kell P, Price D (2007). *British Society for Sexual Medicine (BSSM) Guidelines on the Management of Erectile Dysfunction*. edn.

Haesungcharern A, Chulavatnatol M (1973). Stimulation of human spermatozoal motility by caffeine. *Fertil Steril* **24**(9): 662-665.

Hatzichristou DG, Hatzimouratidis K, Ioannides E, Yannakoyorgos K, Dimitriadis G, Kalinderis A (1998). Nocturnal penile tumescence and rigidity monitoring in young potent volunteers: reproducibility, evaluation criteria and the effect of sexual intercourse. *J Urol* **159**(6): 1921-1926.

Hatzimouratidis K, Amar E, Eardley I, Giuliano F, Hatzichristou D, Montorsi F, *et al.* (2010). Guidelines on Male Sexual Dysfunction: Erectile Dysfunction and Premature Ejaculation. *European Urology* **57**(5): 804-814.

Haynes J, Jr., Kithas PA, Taylor AE, Strada SJ (1991). Selective inhibition of cGMP-inhibitable cAMP phosphodiesterase decreases pulmonary vasoreactivity. *Am J Physiol* **261**(2 Pt 2): H487-492.

Heaton JP, Lording D, Liu SN, Litonjua AD, Guangwei L, Kim SC, *et al.* (2001). Intracavernosal alprostadil is effective for the treatment of erectile dysfunction in diabetic men. *Int J Impot Res* **13**(6): 317-321.

Hedlund P, Aszodi A, Pfeifer A, Alm P, Hofmann F, Ahmad M, *et al.* (2000). Erectile dysfunction in cyclic GMP-dependent kinase I-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(5): 2349-2354.

Hellstrom WJ, Overstreet JW, Yu A, Saikali K, Shen W, Beasley CM, Jr., *et al.* (2003). Tadalafil has no detrimental effect on human spermatogenesis or reproductive hormones. *J Urol* **170**(3): 887-891.

Herrero MB, Perez Martinez S, Viggiano JM, Polak JM, de Gimeno MF (1996). Localization by indirect immunofluorescence of nitric oxide synthase in mouse and human spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* **8**(5): 931-934.

Ho HC, Granish KA, Suarez SS (2002). Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca²⁺ and not cAMP. *Dev Biol* **250**(1): 208-217.

Houslay MD (2001). PDE4 cAMP-specific phosphodiesterases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **69**: 249-315.

Houslay MD, Adams DR (2003). PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem J* **370**(Pt 1): 1-18.

Hryniewicz K, Dimayuga C, Hudaihed A, Androne AS, Zheng H, Jankowski K, *et al.* (2005). Inhibition of angiotensin-converting enzyme and phosphodiesterase type 5 improves endothelial function in heart failure. *Clin Sci (Lond)* **108**(4): 331-338.

Hurley JH (1998). The adenylyl and guanylyl cyclase superfamily. *Curr Opin Struct Biol* **8**(6): 770-777.

Iammarrone E, Balet R, Lower AM, Gillott C, Grudzinskas JG (2003). Male infertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **17**(2): 211-229.

Iwasaki T, Kondo K, Kuroda T, Moritani Y, Yamagata S, Sugiura M, *et al.* (1996). Novel selective PDE IV inhibitors as antiasthmatic agents. Synthesis and biological activities of a series of 1-aryl-2,3-bis(hydroxymethyl)naphthalene lignans. *Journal of Medicinal Chemistry* **39**(14): 2696-2704.

Jackson G, Betteridge J, Dean J, Eardley I, Hall R, Holdright D, *et al.* (2002). A systematic approach to erectile dysfunction in the cardiovascular patient: a Consensus Statement--update 2002. *Int J Clin Pract* **56**(9): 663-671.

Jaiswal BS, Majumder GC (1996). Cyclic AMP phosphodiesterase: a regulator of forward motility initiation during epididymal sperm maturation. *Biochem Cell Biol* **74**(5): 669-674.

Jannini EA, Lombardo F, Salacone P, Gandini L, Lenzi A (2004). Treatment of sexual dysfunctions secondary to male infertility with sildenafil citrate. *Fertil Steril* **81**(3): 705-707.

Jouannet P, Ducot B, Feneux D, Spira A (1988). Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. *Int J Androl* **11**(5): 379-394.

Kanakas N, Sofikitis N, Kawamura H, Mantzavinos T (2001). Effects of Hormones on spermatogenesis in men histological diagnosis of spermatogenic arrest at the primary spermatocytes (PS) stage. VIIth International Congress of Andrology. June 15-19, 2001, Montréal, Canada. Abstracts-President's Posters PP-036 J Androl; 22: 192-204.

Kasper DL, Braunwald E, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson JL (2006). *Harrison - Medicina Interna, 16ª Edição.* edn. The MacGraw-Hill Companies.

Kay VJ, Coutts JR, Robertson L (1993). Pentoxifylline stimulates hyperactivation in human spermatozoa. *Hum Reprod* **8**(5): 727-731.

Kinutani M (1999). Effects of pentoxifylline on sperm motion characteristics in normozoospermic men defined by a computer-aided sperm analysis. *Hiroshima J Med Sci* **48**(4): 117-121.

Kloner RA (2004). Novel phosphodiesterase type 5 inhibitors: assessing hemodynamic effects and safety parameters. *Clin Cardiol* **27**(4 Suppl 1): I20-25.

Kloner RA, Brown M, Prisant LM, Collins M (2001). Effect of sildenafil in patients with erectile dysfunction taking antihypertensive therapy. Sildenafil Study Group. *Am J Hypertens* **14**(1): 70-73.

Koutalos Y, Nakatani K, Yau KW (1995). The cGMP-phosphodiesterase and its contribution to sensitivity regulation in retinal rods. *J Gen Physiol* **106**(5): 891-921.

Kulkarni SU, Usgaonkar LRN (1991). Isocoumarins .23. Synthesis of Some 6,7-Dimethoxy-3-Phenylisocoumarins. *J Indian Chem Soc* **68**(9): 525-526.

Lakin MM, Montague DK, VanderBrug Medendorp S, Tesar L, Schover LR (1990). Intracavernous injection therapy: analysis of results and complications. *J Urol* **143**(6): 1138-1141.

Laties A, Zrenner E (2002). Viagra (sildenafil citrate) and ophthalmology. *Prog Retin Eye Res* **21**(5): 485-506.

Laumann EO, Paik A, Rosen RC (1999). Sexual dysfunction in the United States: prevalence and predictors. *JAMA* **281**(6): 537-544.

Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C (1996). Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod* **55**(3): 684-692.

Lefievre L, De Lamirande E, Gagnon C (2000). The cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor, sildenafil, stimulates human sperm motility and capacitation but not acrosome reaction. *J Androl* **21**(6): 929-937.

Lefievre L, de Lamirande E, Gagnon C (2002). Presence of cyclic nucleotide phosphodiesterases PDE1A, existing as a stable complex with calmodulin, and PDE3A in human spermatozoa. *Biol Reprod* **67**(2): 423-430.

Leungwattanakij S, Flynn V, Jr., Hellstrom WJ (2001). Intracavernosal injection and intraurethral therapy for erectile dysfunction. *Urol Clin North Am* **28**(2): 343-354.

Levin RM, Greenberg SH, Wein AJ (1981). Quantitative analysis of the effects of caffeine on sperm motility and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (AMP) phosphodiesterase. *Fertil Steril* **36**(6): 798-802.

Levine LA, Dimitriou RJ (2001). Vacuum constriction and external erection devices in erectile dysfunction. *Urol Clin North Am* **28**(2): 335-341, ix-x.

Lewis RW (1998). Transurethral alprostadil with MUSE (medicated urethral system for erection) vs intracavernous alprostadil--a comparative study in 103 patients with erectile dysfunction. *Int J Impot Res* **10**(1): 61-62.

Lewis RW, Witherington R (1997). External vacuum therapy for erectile dysfunction: use and results. *World J Urol* **15**(1): 78-82.

Lewis SE, Donnelly ET, Sterling ES, Kennedy MS, Thompson W, Chakravarthy U (1996). Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa: evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility. *Mol Hum Reprod* **2**(11): 873-878.

Lewis SE, Moohan JM, Thompson W (1993). Effects of pentoxifylline on human sperm motility in normospermic individuals using computer-assisted analysis. *Fertil Steril* **59**(2): 418-423.

Li L, Yee C, Beavo JA (1999). CD3- and CD28-dependent induction of PDE7 required for T cell activation. *Science* **283**(5403): 848-851.

Lin CS, Chow S, Lau A, Tu R, Lue TF (2001). Regulation of human PDE5A2 intronic promoter by cAMP and cGMP: identification of a critical Sp1-binding site. *Biochem Biophys Res Commun* **280**(3): 693-699.

Lin CS, Lau A, Tu R, Lue TF (2000). Expression of three isoforms of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in human penile cavernosum. *Biochem Biophys Res Commun* **268**(2): 628-635.

Linnet OI, Ogrinc FG (1996). Efficacy and safety of intracavernosal alprostadil in men with erectile dysfunction. The Alprostadil Study Group. *N Engl J Med* **334**(14): 873-877.

Liu Y, Ruoho AE, Rao VD, Hurley JH (1997). Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: modeling and mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13414-13419.

Lobo JR, Nehra A (2005). Clinical evaluation of erectile dysfunction in the era of PDE-5 inhibitors. *Urol Clin North Am* **32**(4): 447-455, vi.

Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF (1998). Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* **13**(4): 896-900.

Loughney K, Taylor J, Florio VA (2005). 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 11A: localization in human tissues. *Int J Impot Res* **17**(4): 320-325.

MacLeod J, Paupard M, Orr A (1991). *Flagellar-associated cAMP-dependent protein kinases in mammalian sperm*. edn, vol. 75. Raven Press: New York.

Malekmakan L, Shakeri S, Haghpanah S, Pakfetrat M, Sarvestani AS, Malekmakan A (2011). Epidemiology of erectile dysfunction in hemodialysis patients using IIEF questionnaire. *Saudi J Kidney Dis Transpl* **22**(2): 232-236.

Marmor MF, Kessler R (1999). Sildenafil (Viagra) and ophthalmology. *Surv Ophthalmol* **44**(2): 153-162.

Marques JN (2010). Disfunção Sexual Masculina - Disfunção Erétil (<http://www.apurologia.pt/>).

- Marrama P, Baraghini GF, Carani C, Celani MF, Giovenco P, Grandi F, *et al.* (1985). Further studies on the effects of pentoxifylline on sperm count and sperm motility in patients with idiopathic oligo-asthenozoospermia. *Andrologia* **17**(6): 612-616.
- Maurice DH, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Netherton SJ, Raymond DR, *et al.* (2003). Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. *Mol Pharmacol* **64**(3): 533-546.
- Mayer M, Stief CG, Truss MC, Uckert S (2005). Phosphodiesterase inhibitors in female sexual dysfunction. *World J Urol* **23**(6): 393-397.
- McAllisterLucas LM, Haik TL, Colbran JL, Sonnenburg WK, Seger D, Turko IV, *et al.* (1995). An essential aspartic acid at each of two allosteric cGMP-binding sites of a cGMP-specific phosphodiesterase. *Journal of Biological Chemistry* **270**(51): 30671-30679.
- McCullough AR (2003). An update on the PDE-5 inhibitors (PDE-5i). *J Androl* **24**(6 Suppl): S52-58.
- Mewe M, Bauer CK, Muller D, Middendorff R (2006). Regulation of spontaneous contractile activity in the bovine epididymal duct by cyclic guanosine 5'-monophosphate-dependent pathways. *Endocrinology* **147**(4): 2051-2062.
- Michelakis ED, Tymchak W, Noga M, Webster L, Wu XC, Lien D, *et al.* (2003). Long-term treatment with oral sildenafil is safe and improves functional capacity and hemodynamics in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **108**(17): 2066-2069.
- Middendorff R, Muller D, Mewe M, Mukhopadhyay AK, Holstein AF, Davidoff MS (2002). The tunica albuginea of the human testis is characterized by complex contraction and relaxation activities regulated by cyclic GMP. *J Clin Endocrinol Metab* **87**(7): 3486-3499.
- Middendorff R, Muller D, Wichers S, Holstein AF, Davidoff MS (1997). Evidence for production and functional activity of nitric oxide in seminiferous tubules and blood vessels of the human testis. *J Clin Endocrinol Metab* **82**(12): 4154-4161.
- Miller TA (2000). Diagnostic evaluation of erectile dysfunction (<http://www.aafp.org/afp/20000101/95.html>). *Am Fam Physician* **61**(1): 95-104, 109-110.
- Miro X, Perez-Torres S, Palacios JM, Puigdomenech P, Mengod G (2001). Differential distribution of cAMP-specific phosphodiesterase 7A mRNA in rat brain and peripheral organs. *Synapse* **40**(3): 201-214.
- Montague DK, Angermeier KW (2001). Penile prosthesis implantation. *Urol Clin North Am* **28**(2): 355-361, x.

Montorsi F, Corbin J, Phillips S (2004a). Review of phosphodiesterases in the urogenital system: new directions for therapeutic intervention. *J Sex Med* **1**(3): 322-336.

Montorsi F, Deho F, Salonia A, Briganti A, Bua L, Fantini GV, *et al.* (2004b). Penile implants in the era of oral drug treatment for erectile dysfunction. *BJU Int* **94**(5): 745-751.

Montorsi F, Padma-Nathan H, Buvat J, Schwaibold H, Beneke M, Ulbrich E, *et al.* (2004c). Earliest time to onset of action leading to successful intercourse with vardenafil determined in an at-home setting: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Sex Med* **1**(2): 168-178.

Montorsi F, Rigatti P, Carmignani G, Corbu C, Campo B, Ordesi G, *et al.* (2000). AMS three-piece inflatable implants for erectile dysfunction: a long-term multi-institutional study in 200 consecutive patients. *Eur Urol* **37**(1): 50-55.

Moohan JM, Winston RM, Lindsay KS (1993). Variability of human sperm response to immediate and prolonged exposure to pentoxifylline. *Hum Reprod* **8**(10): 1696-1700.

Moohan JM, Winston RM, Lindsay KS (1995). The variable effects of 2'-deoxyadenosine on human sperm motility and hyperactivation in vitro. *Hum Reprod* **10**(5): 1098-1103.

Moreland RB, Hsieh G, Nakane M, Brioni JD (2001). The biochemical and neurologic basis for the treatment of male erectile dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther* **296**(2): 225-234.

Mostafa T (2007). Tadalafil as an in vitro sperm motility stimulant. *Andrologia* **39**(1): 12-15.

Mulcahy JJ (2000). Long-term experience with salvage of infected penile implants. *J Urol* **163**(2): 481-482.

Nakatani K, Chen C, Yau KW, Koutalos Y (2002). Calcium and phototransduction. *Adv Exp Med Biol* **514**: 1-20.

Natsugari H, Ikeura Y, Kiyota Y, Ishichi Y, Ishimaru T, Saga O, *et al.* (1995). Novel, Potent, and Orally-Active Substance-P Antagonists - Synthesis and Antagonist Activity of N-Benzylcarboxamide Derivatives of Pyrido[3,4-B]Pyridine. *Journal of Medicinal Chemistry* **38**(16): 3106-3120.

NIHCCPI (1993). National Institutes of Health Consensus Conference Panel on Impotence: Impotence. *JAMA* **270**: 83-90.

O'Donnell JM (1993). Antidepressant-like effects of rolipram and other inhibitors of cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase on behavior maintained by differential reinforcement of low response rate. *J Pharmacol Exp Ther* **264**(3): 1168-1178.

Padma-Nathan H, Stecher VJ, Sweeney M, Orazem J, Tseng LJ, Deriesthal H (2003). Minimal time to successful intercourse after sildenafil citrate: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Urology* **62**(3): 400-403.

Pang SC, Chan PJ, Lu A (1993). Effects of pentoxifylline on sperm motility and hyperactivation in normozoospermic and normokinetic semen. *Fertil Steril* **60**(2): 336-343.

Parada B, Requixa A, Figueiredo A, Mota A (2004). Infertilidade Masculina e Factores Ambientais. *Acta Urológica* **21; 4: 9-15**.

Paul M, Sumpter JP, Lindsay KS (1996). Factors affecting pentoxifylline stimulation of sperm kinematics in suspensions. *Hum Reprod* **11**(9): 1929-1935.

Philipp J, Mitchell PJ, Malipiero U, Fontana A (1994). Cell type-specific regulation of expression of transcription factor AP-2 in neuroectodermal cells. *Dev Biol* **165**(2): 602-614.

Pomara G, Morelli G, Canale D, Turchi P, Caglieresi C, Moschini C, *et al.* (2007). Alterations in sperm motility after acute oral administration of sildenafil or tadalafil in young, infertile men. *Fertil Steril* **88**(4): 860-865.

Ponchiotti R, Raugeri A, Lanciotti E, Ademollo B, Galvan P, Poggini G (1984). Calcium, zinc, magnesium, concentration in seminal plasma of infertile men with prostatitis. *Acta Eur Fertil* **15**(4): 283-285.

Porst H (2002). IC351 (tadalafil, Cialis): update on clinical experience. *Int J Impot Res* **14 Suppl 1**: S57-64.

Porst H (1996). The rationale for prostaglandin E1 in erectile failure: a survey of worldwide experience. *J Urol* **155**(3): 802-815.

Prickaerts J, Sik A, van der Staay FJ, de Vente J, Blokland A (2005). Dissociable effects of acetylcholinesterase inhibitors and phosphodiesterase type 5 inhibitors on object recognition memory: acquisition versus consolidation. *Psychopharmacology (Berl)* **177**(4): 381-390.

Prickaerts J, Sik A, van Staveren WC, Koopmans G, Steinbusch HW, van der Staay FJ, *et al.* (2004). Phosphodiesterase type 5 inhibition improves early memory consolidation of object information. *Neurochem Int* **45**(6): 915-928.

Prickaerts J, van Staveren WC, Sik A, Markerink-van Ittersum M, Niewohner U, van der Staay FJ, *et al.* (2002). Effects of two selective phosphodiesterase type 5 inhibitors, sildenafil and vardenafil, on object recognition memory and hippocampal cyclic GMP levels in the rat. *Neuroscience* **113**(2): 351-361.

Purvis K, Muirhead GJ, Harness JA (2002). The effects of sildenafil citrate on human sperm function in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*; **53**: 53S-60S.

- Rajmil O, Fernandez M, Blasco A, Arrus JA, Montanes R, Rodriguez-Espinosa J (2011). [Association of nocturnal penile rigidity with testosterone, metabolic syndrome, and other variables: a prospective cross-sectional pilot study]. *Actas Urol Esp* **35**(8): 459-467.
- Rall TW, Sutherland EW (1958). Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J Biol Chem* **232**(2): 1065-1076.
- Rees JM, Ford WC, Hull MG (1990). Effect of caffeine and of pentoxifylline on the motility and metabolism of human spermatozoa. *J Reprod Fertil* **90**(1): 147-156.
- Reinhardt RR, Chin E, Zhou J, Taira M, Murata T, Manganiello VC, *et al.* (1995). Distinctive anatomical patterns of gene expression for cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Clin Invest* **95**(4): 1528-1538.
- Revelli A, Ghigo D, Moffa F, Massobrio M, Tur-Kaspa I (2002). Guanylate cyclase activity and sperm function. *Endocr Rev* **23**(4): 484-494.
- Revelli A, Soldati G, Costamagna C, Pellerey O, Aldieri E, Massobrio M, *et al.* (1999). Follicular fluid proteins stimulate nitric oxide (NO) synthesis in human sperm: a possible role for NO in acrosomal reaction. *J Cell Physiol* **178**(1): 85-92.
- Richter W, Dettmer D, Glander H (1999). Detection of mRNA transcripts of cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes in ejaculated human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* **5**(8): 732-736.
- Rodriguez-Iturbe B, Ferrebuz A, Vanegas V, Quiroz Y, Espinoza F, Pons H, *et al.* (2005). Early treatment with cGMP phosphodiesterase inhibitor ameliorates progression of renal damage. *Kidney Int* **68**(5): 2131-2142.
- Rosselli M, Dubey RK, Imthurn B, Macas E, Keller PJ (1995). Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity. *Hum Reprod* **10**(7): 1786-1790.
- Rubio-Aurioles E, Porst H, Eardley I, Goldstein I (2006). Comparing Vardenafil and Sildenafil in the Treatment of Men with Erectile Dysfunction and Risk Factors for Cardiovascular Disease: A Randomized, Double-Blind, Pooled Crossover Study. *The Journal of Sexual Medicine* **3**(6): 1037-1049.
- Ruppert D, Weithmann KU (1982). HL 725, an extremely potent inhibitor of platelet phosphodiesterase and induced platelet aggregation in vitro. *Life Sci* **31**(19): 2037-2043.
- Saenz de Tejada I, Angulo J, Cuevas P, Fernandez A, Moncada I, Allona A, *et al.* (2001). The phosphodiesterase inhibitory selectivity and the in vitro and in vivo potency of the new PDE5 inhibitor vardenafil. *Int J Impot Res* **13**(5): 282-290.

Sarfati M, Mateo V, Baudet S, Rubio M, Fernandez C, Davi F, *et al.* (2003). Sildenafil and vardenafil, types 5 and 6 phosphodiesterase inhibitors, induce caspase-dependent apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* **101**(1): 265-269.

Schill WB (1975). Caffeine- and kallikrein-induced stimulation of human sperm motility: a comparative study. *Andrologia* **7**(3): 229-236.

Schill WB, Pritsch W, Preissler G (1979). Effect of caffeine and kallikrein on cryo-preserved human spermatozoa. *Int J Fertil* **24**(1): 27-32.

Scipioni A, Stefanini S, Santone R, Giorgi M (2005). Immunohistochemical localisation of PDE5 in Leydig and myoid cells of prepuberal and adult rat testis. *Histochem Cell Biol* **124**(5): 401-407.

Seeley RR, Stephens TD, Tate P (2004). *Anatomy and Physiology, Sixth Edition*. edn. The MacGraw-Hill Companies.

Setter SM, Iltz JL, Fincham JE, Campbell RK, Baker DE (2005). Phosphodiesterase 5 inhibitors for erectile dysfunction. *Ann Pharmacother* **39**(7-8): 1286-1295.

Shen MR, Chiang PH, Yang RC, Hong CY, Chen SS (1991). Pentoxifylline stimulates human sperm motility both in vitro and after oral therapy. *Br J Clin Pharmacol* **31**(6): 711-714.

Sikka SC, Hellstrom WJ (1991). The application of pentoxifylline in the stimulation of sperm motion in men undergoing electroejaculation. *J Androl* **12**(3): 165-170.

Smith SJ, Brookes-Fazakerley S, Donnelly LE, Barnes PJ, Barnette MS, Giembycz MA (2003). Ubiquitous expression of phosphodiesterase 7A in human proinflammatory and immune cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **284**(2): L279-289.

Soderling SH, Bayuga SJ, Beavo JA (1998). Cloning and characterization of a cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(15): 8991-8996.

Sofikitis N, Miyagawa I, Toda T, Terakawa N (1993a). Effects of an inhibitor of adenylate cyclase on acrosome reaction induced by protein kinase C activators. *Arch Androl* **30**(2): 87-92.

Sofikitis NV, Miyagawa I (1993b). Endocrinological, biophysical, and biochemical parameters of semen collected via masturbation versus sexual intercourse. *J Androl* **14**(5): 366-373.

Souness JE, Aldous D, Sargent C (2000). Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of cyclic AMP phosphodiesterase (PDE) type 4 inhibitors. *Immunopharmacology* **47**(2-3): 127-162.

Stefanovich V (1973). Effect of 3,7-dimethyl-1-(5-oxo-hexyl)xanthine and 1-hexyl-3,7-dimethyl xanthine on cyclic AMP phosphodiesterase of the human umbilical cord vessels. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **5**(3): 655-662.

Straub RE, Lehner T, Luo Y, Loth JE, Shao W, Sharpe L, *et al.* (1994). A possible vulnerability locus for bipolar affective disorder on chromosome 21q22.3. *Nat Genet* **8**(3): 291-296.

Stryer L, Jeremy B, Tymoczko J (2001). *Biochemistry, Fifth Edition*. edn. W. H. Freeman and Company: New York.

Swinnen JV, Joseph DR, Conti M (1989). Molecular cloning of rat homologues of the *Drosophila melanogaster* dunce cAMP phosphodiesterase: evidence for a family of genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(14): 5325-5329.

Takimoto E, Champion HC, Li M, Belardi D, Ren S, Rodriguez ER, *et al.* (2005). Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med* **11**(2): 214-222.

Tamura N, Doolittle LK, Hammer RE, Shelton JM, Richardson JA, Garbers DL (2004). Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(49): 17300-17305.

Tasdemir M, Tasdemir I, Kodama H, Tanaka T (1993). Pentoxifylline-enhanced acrosome reaction correlates with fertilization in vitro. *Hum Reprod* **8**(12): 2102-2107.

Tash JS, Means AR (1983). Cyclic adenosine 3',5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biol Reprod* **28**(1): 75-104.

Tesarik J, Mendoza C, Carreras A (1992a). Effects of phosphodiesterase inhibitors caffeine and pentoxifylline on spontaneous and stimulus-induced acrosome reactions in human sperm. *Fertil Steril* **58**(6): 1185-1190.

Tesarik J, Thebault A, Testart J (1992b). Effect of pentoxifylline on sperm movement characteristics in normozoospermic and asthenozoospermic specimens. *Hum Reprod* **7**(9): 1257-1263.

Thadani U, Smith W, Nash S, Bittar N, Glasser S, Narayan P, *et al.* (2002). The effect of vardenafil, a potent and highly selective phosphodiesterase-5 inhibitor for the treatment of erectile dysfunction, on the cardiovascular response to exercise in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* **40**(11): 2006-2012.

Thompson WJ, Terasaki WL, Epstein PM, Strada SJ (1979). Assay of cyclic nucleotide phosphodiesterase and resolution of multiple molecular forms of the enzyme. *Adv Cyclic Nucleotide Res* **10**: 69-92.

Tolra JR, Campana JM, Ciutat LF, Miranda EF (2006). Prospective, randomized, open-label, fixed-dose, crossover study to establish preference of patients with erectile dysfunction after taking the three PDE-5 inhibitors. *J Sex Med* **3**(5): 901-909.

Tournaye H, Janssens R, Devroey P, van Steirteghem A (1994a). The influence of pentoxifylline on motility and viability of spermatozoa from normozoospermic semen samples. *Int J Androl* **17**(1): 1-8.

Tournaye H, Van Steirteghem AC, Devroey P (1994b). Pentoxifylline in idiopathic male-factor infertility: a review of its therapeutic efficacy after oral administration. *Hum Reprod* **9**(6): 996-1000.

Tur-Kaspa I, Segal S, Moffa F, Massobrio M, Meltzer S (1999). Viagra for temporary erectile dysfunction during treatments with assisted reproductive technologies. *Hum Reprod* **14**(7): 1783-1784.

Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ (1998). Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod* **13**(6): 1429-1436.

Ukita T, Nakamura Y, Kubo A, Yamamoto Y, Takahashi M, Kotera J, *et al.* (1999a). 1-arylnaphthalene lignan: A novel scaffold for type 5 phosphodiesterase inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry* **42**(7): 1293-1305.

Ukita T, Sugahara M, Terakawa Y, Kuroda T, Wada K, Nakata A, *et al.* (1999b). Novel, potent, and selective phosphodiesterase-4 inhibitors as antiasthmatic agents: Synthesis and biological activities of a series of 1-pyridylnaphthalene derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* **42**(6): 1088-1099.

Vardi Y, Bulus M, Reisner S, Nassar S, Aboud L, Sprecher E, *et al.* (2003). Effects of sildenafil citrate (Viagra) on hemodynamic parameters during exercise testing and occurrence of ventricular arrhythmias in patients with erectile dysfunction and cardiovascular disease. *Eur Urol* **43**(5): 544-551.

Veske A, Oehlmann R, Younus F, Mohyuddin A, Muller-Myhsok B, Mehdi SQ, *et al.* (1996). Autosomal recessive non-syndromic deafness locus (DFNB8) maps on chromosome 21q22 in a large consanguineous kindred from Pakistan. *Hum Mol Genet* **5**(1): 165-168.

Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, *et al.* (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* **121**(4): 1139-1150.

Waldman SA, Murad F (1987). Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev* **39**(3): 163-196.

Wang C, Chan CW, Wong KK, Yeung KK (1983). Comparison of the effectiveness of placebo, clomiphene citrate, mesterolone, pentoxifylline, and testosterone rebound therapy for the treatment of idiopathic oligospermia. *Fertil Steril* **40**(3): 358-365.

Wang P, Wu P, Egan RW, Billah MM (2001). Human phosphodiesterase 8A splice variants: cloning, gene organization, and tissue distribution. *Gene* **280**(1-2): 183-194.

Wayman C, Phillips S, Lunny C, Webb T, Fawcett L, Baxendale R, *et al.* (2005). Phosphodiesterase 11 (PDE11) regulation of spermatozoa physiology. *Int J Impot Res* **17**(3): 216-223.

Whalin ME, Scammell JG, Strada SJ, Thompson WJ (1991). Phosphodiesterase II, the cGMP-activatable cyclic nucleotide phosphodiesterase, regulates cyclic AMP metabolism in PC12 cells. *Mol Pharmacol* **39**(6): 711-717.

Wright PJ (2006). Comparison of phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors. *Int J Clin Pract* **60**(8): 967-975.

Yamamoto Y, Sofikitis N, Mio Y, Miyagawa I (2000). Influence of sexual stimulation on sperm parameters in semen samples collected via masturbation from normozoospermic men or cryptozoospermic men participating in an assisted reproduction programme. *Andrologia* **32**(3): 131-138.

Yanagimachi R (1994). *The Physiology of Reproduction - Mammalian fertilization*. edn, vol. 2nd. Knobil E, Neill JD, editors. Raven Press: New York.

Yovich JM, Edirisinghe WR, Cummins JM, Yovich JL (1990). Influence of pentoxifylline in severe male factor infertility. *Fertil Steril* **53**(4): 715-722.

Yovich JM, Edirisinghe WR, Cummins JM, Yovich JL (1988). Preliminary results using pentoxifylline in a pronuclear stage tubal transfer (PROST) program for severe male factor infertility. *Fertil Steril* **50**(1): 179-181.

Yunes R, Fernandez P, Doncel GF, Acosta AA (2005). Cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibition increases tyrosine phosphorylation and hyper motility in normal and pathological human spermatozoa. *Biocell* **29**(3): 287-293.

Zhang HT, O'Donnell JM (2000). Effects of rolipram on scopolamine-induced impairment of working and reference memory in the radial-arm maze tests in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **150**(3): 311-316.

Zhang L, Zhang Z, Zhang RL, Cui Y, LaPointe MC, Silver B, *et al.* (2006a). Tadalafil, a long-acting type 5 phosphodiesterase isoenzyme inhibitor, improves neurological functional recovery in a rat model of embolic stroke. *Brain Res* **1118**(1): 192-198.

Zhang RL, Zhang Z, Zhang L, Wang Y, Zhang C, Chopp M (2006b). Delayed treatment with sildenafil enhances neurogenesis and improves functional recovery in aged rats after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res* **83**(7): 1213-1219.

Zhang X, Feng Q, Cote RH (2005). Efficacy and selectivity of phosphodiesterase-targeted drugs in inhibiting photoreceptor phosphodiesterase (PDE6) in retinal photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**(9): 3060-3066.

Zinaman MJ, Brown CC, Selevan SG, Clegg ED (2000). Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *J Androl* **21**(1): 145-153.